RÉPUBLIQUE FRANÇAISE — MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ANNALES DE L'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

SÉRIE E

ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

LES CONSTITUANTS PURIQUES ET PYRIMIDIQUES DES LEVURES ET LA DÉGRADATION AUTOLYTIQUE DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE

par A. BOURDET

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, rue Keppler - Paris

A MES PARENTS

Témoignage de ma reconnaissance

A MA FEMME ET A MES ENFANTS

Témoignage de mon affection

AVANT-PROPOS

Au terme de ce travail, c'est nous acquitter d'un pieux devoir que de rendre un hommage ému et reconnaissant à la mémoire de notre regretté Maître Raymond GUILLEMET, Docteur ès-Sciences Physiques, Directeur de Recherches à l'I. N. R. A. Trop tôt disparu, il fut le promoteur de notre carrière scientifique et sa satisfaction eût été grande s'il lui avait été donné de voir achevé le travail qu'il nous avait confié.

C'est en janvier 1943, que Raymond GUILLEMET nous accueillait dans son laboratoire et guidait nos premiers pas de biochimiste en nous initiant aux techniques de l'expérimentation méticuleuse, telles qu'il les tenait lui-même de son Maître NICLOUX.

C'est en 1950, un an avant sa mort, qu'il orientait nos recherches vers ce vaste domaine de la Biochimie des Acides Nucléiques chez les levures où se rejoignaient à la fois les préoccupations de la Science pure et de la Technologie agricole. Privé de sa bienveillante autorité, nous nous sommes efforcé, tout au long de ce travail, de nous montrer digne de la confiance qu'il avait mise en nous et de l'exemple qu'il nous avait laissé.

Nous remercions respectueusement et assurons de notre profonde gratitude Monsieur le Professeur C. FROMAGEOT qui a bien voulu accepter de juger notre Première Thèse ainsi que Monsieur le Professeur R. WURMSER qui nous a fait l'honneur de présider notre Jury.

Notre reconnaissance va également à Mademoiselle E. LEBRETON, Professeur à la Faculté, qui a bien voulu se charger d'apprécier notre Deuxième Thèse ainsi qu'à Monsieur Edgar LEDERER, Maître de Conférence, qui a accepté d'être notre examinateur.

Que Monsieur le Professeur E. F. TERROINE, qui présida en 1936 le Jury de Thèse de Raymond GUILLEMET, trouve ici l'hommage de notre déférente gratitude et de notre respectueuse reconnaissance pour l'intérêt qu'il a bien voulu prendre à notre travail et pour les précieux conseils qu'il nous a prodigués.

Notre reconnaissance ira encore à Monsieur le Professeur P. GRABAR, Chef de service à l'Institut Pasteur, qui sut toujours, au nom de l'amitié qui le liait à GUILLEMET, stimuler nos efforts de ses encouragements.

Nous pensons que Monsieur le Professeur P. MANDEL accueillera avec plaisir à Strasbourg, dans les lieux mêmes où il fut en son temps

l'élève de GUILLEMET, la synthèse d'un travail dont il orienta les premières étapes ; qu'il trouve ici le témoignage de notre amitié et de notre gratitude.

C'est encore pour nous un agréable devoir que d'adresser nos remerciements à Monsieur le Directeur de l'Institut National de la Recherche Agronomique, à Monsieur l'Inspecteur Général BUSTARRET, ainsi qu'à Monsieur FLANZY, Directeur Central de Recherches à cet Institut, pour la confiance qu'ils ont bien voulu nous témoigner et les facilités de travail qu'ils nous ont accordées.

Nos remerciements s'adressent encore de façon toute particulière à Monsieur A. GAUDIN, Directeur de l'Ecole Française de Meunerie, ainsi qu'à Monsieur J. BURE, Professeur dans cet établissement, auxquels nous lie depuis de longues années une collaboration amicale et dont la constante obligeance nous a permis de mener à bien et dans les meilleures conditions une grande part de notre travail expérimental.

Nous tenons à remercier aussi bien vivement Madame Y. KHOUVINE, Maître de Recherches au C. N. R. S. et Monsieur L. CHEVILLARD, Directeur à l'Ecole des Hautes Etudes, des moyens matériels qu'ils ont aimablement mis à notre disposition dans les premiers stades de ce travail. Nous remercions de la même façon le Docteur E. BARBU, près de qui nous avons trouvé, à l'Institut Pasteur, l'accueil le plus amical et avec qui il nous a été donné d'échanger de fructueuses réflexions.

A Mademoiselle Jeanine HERARD, notre dévouée collaboratrice, qui sut s'acquitter de sa tâche avec un soin scrupuleux et constant sans jamais ménager sa peine, nous adressons aussi nos biens sincères remerciements.

Nous remercions enfin de leur collaboration toujours amicale, nos camarades A. GUILBOT, L. PETIT et R. DRAPRON, formés avec nous à l'école de GUILLEMET et auxquels nous lient depuis quinze ans bien des souvenirs communs, en y associant tous ceux qui, à des titres divers, ont contribué à l'achèvement de notre tâche.

LES CONSTITUANTS PURIQUES ET PYRIMIDIQUES DES LEVURES ET LA DÉGRADATION AUTOLYTIQUE DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE

LES CONSTITUANTS PURIQUES ET PYRIMIDIQUES DES LEVURES ET LA DÉGRADATION AUTOLYTIQUE DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE

INTRODUCTION

Dans le domaine des recherches biochimiques, les levures ont toujours constitué un matériel de choix et elles ont contribué pour une grande part au développement des concepts de base de l'enzymologie. De même les travaux ayant pour objet l'étude des constituants puriques et pyrimidiques présents dans les cellules soit à l'état libre, soit dans les molécules complexes hautement polymérisées, ont souvent fait appel aux levures.

On connaît en effet depuis longtemps le rôle joué par les adénosine phosphates, ou certains nucléotides qui en dérivent, dans le métabolisme respiratoire et fermentaire en tant que coenzymes ou transporteurs de phosphore ; mais ce n'est que tout récemment que la présence de composés phosphorés similaires dérivant de la guanosine, de l'uridine et de la cytidine a pu être mise en évidence et dont, pour la plupart, le rôle dans le métabolisme reste a être précisé.

On sait d'autre part que, des 2 types d'acides nucléiques qui constituent chez les levures la fraction purique-pyrimidique polymérisée, l'acide ribonucléique (ARN) est considéré actuellement comme étroitement lié aux phénomènes fondamentaux de la vie cellulaire : synthèse protéique et croissance.

L'étude des constituants puriques et pyrimidiques libres ou polymérisés des levures participant soit aux réactions enzymatiques et énergétiques, soit aux synthèses biologiques, tout en contribuant à préciser des notions de biochimie cellulaire, reste étroitement liée à certains problèmes pratiques de croissance et d'activité fermentaire, intéressant à la fois les industries productrices et utilisatrices de levures.

De même, l'étude de la dégradation autolytique de l'ARN, tout en permettant de préciser les étapes successives de cet aspect particulier du catabolisme cellulaire, ainsi que la nature et l'action des systèmes enzymatiques mis en jeu, est en rapport direct avec certains problèmes très souvent posés par le phénomène d'autolyse dans de nombreuses technologies agricoles utilisatrices de levures.

On sait l'importance que peut avoir l'autolyse de la levure en technologie boulangère par l'influence néfaste que peuvent exercer les enzymes libérés sur les propriétés plastiques des pâtes et par le rôle favorable de certains produits excrétés sur l'arôme du pain. En brasserie et en œnologie, il est reconnu que les modifications apportées à la stabilité des moûts et à l'arôme de la bière et des vins demeurent sous la dépendance des phénomènes d'autolyse des levures. On connaît encore l'importance des autolysats de levure dans l'industrie des antibiotiques, dans l'amélioration de la valeur nutritionnelle des rations en alimentation animale ou humaine, ainsi que le rôle thérapeutique attribué aux acides nucléiques ou à certains de leurs dérivés. Autant de raisons pour consacrer à l'autolyse des levures une étude détaillée.

Le travail que nous présentons, effectué au Laboratoire de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales de l'Institut National de la Recherche Agronomique, comprend 2 parties :

— La première, analytique et statique, concerne l'étude qualitative et quantitative des constituants cellulaires puriques et pyrimidiques libres des levures, des acides nucléiques et de certaines formes phosphorées susceptibles de fausser les déterminations quantitatives.

— La deuxième partie, pouvant être qualifiée de dynamique, traite d'un des aspects de la physiologie des levures intéressant le catabolisme ribonucléique dans le cas particulier de la dégradation autolytique.

Ces 2 parties sont précédées d'une revue bibliographique des travaux effectués dans ce domaine et d'un exposé détaillé des méthodes analytiques que nous avons utilisées.

Dans ce travail commencé il y a 5 ans, la chromatographie de partage sur papier, alors en honneur, a constitué notre méthode d'étude fondamentale. Depuis, le développement de la chromatographie d'échange d'ions, marquant une nouvelle étape dans le perfectionnement des techniques d'analyse biochimique, a permis d'acquérir de nouvelles connaissances. Tout en offrant des possibilités plus étendues, cette méthode a révélé certaines insuffisances de la seule chromatographie sur papier, en particulier la très faible concentration des produits isolés, rendant très souvent leur analyse délicate. En revanche, la chromatographie de partage sur papier présente l'avantage d'éviter la manipulation de grands volumes de liquides contenant peu de substances et d'utiliser un outillage simple.

La méthode chromatographique que nous avons mise en œuvre a permis d'isoler non seulement les composés puriques et pyrimidiques libres des cellules intactes, mais encore ceux mis en liberté au cours de la dégradation. C'est ainsi que l'étude des divers systèmes nucléasiques a pu être faite indirectement par l'intermédiaire des produits du catabolisme ribonucléique selon un principe mis en pratique par divers chercheurs.

Cette étude indirecte des activités enzymatiques, par le fait même qu'elle concernait des phénomènes d'autolyse, n'a pas nécessité l'isolement et la purification des systèmes enzymatiques en cause. Si de telles purifications présentent un intérêt incontestable dans l'étude de la cinétique des réactions, il n'en reste pas moins vrai qu'à maintes reprises, au cours de ces dernières années, tant dans le domaine animal que végétal, l'emploi d'extraits cellulaires non fractionnés s'est substitué avantageusement à l'utilisation de préparations enzymatiques purifiées.

C'est d'autre part la très faible teneur des cellules des levures en ADN qui a permis une étude valable du catabolisme ribonucléique sans isolement préalable du substrat ; et nous aurons l'occasion de montrer que l'isolement et la purification de l'ARN modifient plus ou moins profondément sa composition.

C'est en raison de sa concentration élevée dans les cellules que l'ARN de levure a constitué le substrat fondamental dans les nombreuses études de dégradation effectuées « in vitro » à l'aide de systèmes enzymatiques les plus divers et c'est à partir de cet ensemble important de travaux qu'ont pu, au cours des dernières années, être développées et précisées nos connaissances sur la structure des acides ribonucléiques.

En abordant cet aspect particulier du catabolisme ribonucléique, notre intention visait davantage à préciser les mécanismes enzymatiques mal connus par lesquels les cellules effectuent la dégradation de leur propre substance, que de vouloir éclairer, sinon résoudre, le problème si complexe de la structure des acides ribonucléiques.

TRAVAUX ANTÉRIEURS

LES CONSTITUANTS PURIQUES ET PYRIMIDIQUES DES LEVURES

On sait peu de choses sur la teneur des levures en purines et pyrimidines totales. En ce qui concerne les purines, des déterminations chimiques portant sur des levures de brasserie et de boulangerie ont été effectuées par KUEN et PURINGEN (144) puis DIRR et DECKER (79). Les résultats de ces derniers auteurs indiquent que l'azote purique représente de 7,2 à 11,4 p. 100 de l'azote total. A notre connaissance, aucun travail relatif aux pyrimidines n'a été publié.

L'essentiel du matériel purique et pyrimidique des levures est constitué par les acides nucléiques avec prédominance quantitative de l'acide ribonucléique (ARN). Les acides nucléiques constituent la fraction cellulaire purique et pyrimidique « insoluble » par opposition aux autres composés de même nature extractibles en milieu acide. Dans un travail préliminaire, nous avons fait état de l'importance respective de ces 2 fractions chez une levure de brasserie (27).

Nous allons examiner l'essentiel des travaux qui ont eu pour objet l'étude d'une part des constituants cellulaires puriques et pyrimidiques acido-solubles, d'autre part des acides nucléiques des levures.

I. — CONSTITUANTS CELLULAIRES ACIDO-SOLUBLES

On a, depuis déjà plusieurs décades, établi l'identité de certains nucléotides cellulaires participant au métabolisme respiratoire et fermentaire comme coenzymes (di et triphosphopyridine nucléotides) ou donneurs de phosphore (adénosine mono, di et triphosphates) et dans la molécule desquels l'acide phosphorique estérifie l'hydroxyle en position 5 du ribose de l'adénosine. Le perfectionnement récent des méthodes d'analyse a permis, au cours des dernières années, de mettre en évidence des nucléotides de structure analogue dérivés de la guanosine, de la cytidine et de l'uridine.

Pour la première fois en 1950, LELOIR et ses élèves isolaient de la levure un constituant nucléotidique dérivé de l'uridine 5' diphosphate, apparenté aux composés signalés par PARK (201-202-203) s'accumulant chez *S. aureus* mis en présence de pénicilline.

Dans une note préliminaire concernant le stock purique-pyrimidique total et ribonucléique d'une levure de brasserie (27) nous signalions nous-mêmes l'isolement par chromatographie sur papier d'un composé nucléotidique acido-soluble dérivé de l'uridine et mettions en évidence l'exis-

tence corrélative de constituants cellulaires libres à base de guanine et de cytosine. Alors que ce travail était poursuivi, de nombreux résultats analytiques venaient préciser la nature biochimique de ces nucléotides jusqu'alors inconnus.

A. — Dérivés de l'adénine, de la guanine, de l'uracile et de la cytosine.

Dans le tableau I suivant sont énumérés tous les constituants puriques et pyrimidiques acido-solubles actuellement connus et isolés des levures ainsi que le rôle biochimique attribué à certains d'entre eux. Aux méthodes classiques d'extraction et de purification ont été le plus souvent associées les techniques chromatographiques modernes. Des ouvrages récents (21-151) ont d'ailleurs passé en revue les très nombreux travaux traitant de la séparation et de l'isolement des composés puriques et pyrimidiques par chromatographie.

La chromatographie de partage sur papier n'a guère été utilisée dans ce domaine et le seul essai effectué en ce sens (85) ne semble pas avoir conduit à des résultats très satisfaisants. Par contre, la chromatographie d'échange d'ions a permis tout récemment un fractionnement très poussé d'extraits alcoolique (37) et perchlorique (229) de levure.

B. — Agents de précipitation.

On sait depuis longtemps que les composés puriques et pyrimidiques à petite molécule : nucléotides, nucléosides et bases sont précipitables à des titres divers par certains métaux (Al, Zn) et plus particulièrement par les métaux lourds (Ag, Pb, Hg, Ur) et alcalino-terreux (Ba et Ca). Cette propriété a été très souvent mise à profit pour les isoler de leurs solutions acides ; mais le plus souvent la précipitation n'est pas quantitative ou bien elle n'intéresse qu'une catégorie limitée de composés. Aucun travail n'a, jusqu'à présent, indiqué de mode opératoire permettant de précipiter quantitativement un mélange complexe de composés puriques et pyrimidiques.

Métaux lourds

L'Argent en solution ammoniacale a été longtemps considéré comme agent de précipitation des bases puriques (195-218-220) ; mais on a signalé ultérieurement qu'il ne précipitait ni l'acide inosique (207) ni l'adénosine et l'AM_5P (130). Kerr et Seraidarian (130) en remplaçant l'ammoniaque par la soude, ont observé que le nitrate d'Ag aux pH légèrement alcalins, précipite quantitativement les nucléotides puriques (AM_5P), les nucléosides (adénosine, inosine, guanosine) et les bases correspondantes.

Tableau I

Constituants puriques et pyrimidiques acido-solubles des levures.

Dérivés de	Nature du Constituant	Abréviation	Rôle biochimique	Méthodes : Isolement	Méthodes : Purification	Méthodes : Dosage	Teneurs (p/g mat. sèche) : γ	Teneurs (p/g mat. sèche) : μM
Adénine	Triphosphopyridine nucléotide	TPN	Coenzymes accepteurs d'H_2 dans les transformations oxydatives du métabolisme intermédiaire	chrom. éch. d'ions (78.229)			170 (150)	0,22
	Diphosphopyridine nucléotide	DPN		sel Ag (129.150.262.265.274) ; sel Hg (37) ; solv. organ. (56.245) ; adsorpt. s charbon ; chrom. éch. d'ions (78.196 229.)	solv. organ. (140.275) ; chrom. éch. d'ions (150.196)	Poids de la préparation	1700 (150)	2,5
	Adénosine 5' monophosphate	AM_5P	Donneurs de P dans le métabolisme respiratoire et fermentaire	sel Hg (37.36) chrom. éch. d'ions ; chrom. échan. d'ions (78.229)				
	Adénosine 5' diphosphate	ADP		sel Hg (36 37) chrom. éch. d'ions ; chrom. éch. d'ions (78.229)				
	Adénosine 5' triphosphate	ATP		chrom. éch. d'ions (78.229) ; extr. pHCl $pH \geq 2,5$, 1 min, 100°C (241)		enzymatique (ATPase myosine) (241)	3.400.4200 (241)	6,7 . 8,3
	Inosine 5' monophosphate	IM_5P		sel Hg (36.37) chrom. éch. d'ions ; chrom. éch. d'ions (229)				
	Inosine 5' triphosphate	ITP		identifié indirect. d'après action physiol. s rythme cardiaque (134)				
	Diadénosine tétraphosphate (134)	DATP	coenzyme de la fermentat. alcoolique	solv. organ. (199) chrom. éch. d'ions				
	Flavine adénine dinucléotide	FAD	gpt prosthétique de nbx enzymes oxydatifs	solv. organ. (124.125.269) ; sels Ag . Ba ; chrom. éch. d'ions (78.229)		spectrophotométrie	66 (78.266)	0,08
	Coenzyme A	CoA	ds réactions de transacétylation	adsorpt. s. charbon (16) ; ppté p. Cu_2O ; chrom. éch. d'ions (78.238)			850 (150)	1,10
	Thiométhyl - adénosine (175.246.247)	TMA	réserve cellulaire de S et gpts $-CH_3$	ppté ac. phosphotungst. ; chrom. s. papier (38.222.236.234.270)		colorimétrie (nitroprussiate) (222)	5000.6000 (236)	17.20
	Thioéthyl - adénosine	TEA		ppte ac. phosphotungst. ; chrom. s. papier (223)			4300 (223)	14
Guanine	Guanosine 5' monophosphate	GM_5P		sel Hg (36) chrom. éch. d'ions ; chrom. éch. d'ions (229)				
	Guanosine 5' diphosphate	GDP	coenz. phosphoryl. ADP et scission succinyl. CoA (10)	$BaCl_2$ - éthanol (10) chrom. éch. d'ions ; chrom. éch. d'ions (229)			80 (10)	0,18
	Guanosine 5' triphosphate	GTP		$BaCl_2$ - éthanol (10) chrom. éch. d'ions ; chrom. éch. d'ions (229)				
	Guan. diphosphate. mannose	GDPM		sel Hg (36.153) chrom. éch. d'ions				
Uracile	Uridine 5' monophosphate	UM_5P		sel Hg (36.37) chrom. éch. d'ions ; chrom. éch. d'ions (229)				
	Uridine 5' diphosphate	UDP		sel Hg (36) chrom. éch. d'ions ; chrom. éch. d'ions (229)				
	Uridine 5' triphosphate	UTP		$BaCl_2$ - éthanol (10) chrom. éch. d'ions ; chrom. éch. d'ions (158.229)				
	Urid. 5' diphosph. glucose (254)	UDPG	coenzyme de la galactowaldénase (154)	sel Hg (36.37.39.40) chrom. éch. d'ions ; chrom. éch. d'ions (229)			950.1900 (39)	1,7 . 3,4
	Urid. 5' diphosph. galactose	UDPGa		sel Hg (154) chrom. éch. d'ions ; chrom. éch. d'ions (229)				
	Uridine 5' diphosphate acétyl - glucosamine	UDPAG		sel Hg (37.200) chrom. éch. d'ions ; chrom. éch. d'ions (229)			130.450 (37)	0,2 . 0,7
	Uridine 5' diphosphate acide glucuronique	UDPGl		chrom. éch. d'ions (229)				
Cytosine	Cytidine 5' monophosphate	CM_5P		chrom. éch. d'ions (229)				
	Cytidine 5' diphosphate	CDP		chrom. éch. d'ions (229)				
	Cytidine 5' triphosphate	CTP		chrom. éch. d'ions (229)				

En milieu acide (pH 1,5-2) par contre, seules les bases puriques sont précipitées ce qui permet de les séparer quantitativement des nucléosides et nucléotides correspondants. Les mêmes auteurs devaient signaler ultérieurement (131) qu'en milieu légèrement alcalin (NaOH), l'argent précipite quantitativement l'acide cytidylique, mais partiellement l'acide uridylique, la précipitation de ce dernier pouvant être achevée par addition de 3 volumes d'isopropanol.

L'acétate basique de *Plomb* ou l'acétate de plomb en milieu ammoniacal précipitent les nucléosides. Ces derniers échappent à la précipitation avec les solutions neutres ou acides d'acétate qui, au contraire précipitent les nucléotides (120-156). Le DPN n'est cependant pas précipité dans ces conditions, alors que le TPN est précipitable ainsi que l'AM_5P (122).

L'Urane, à l'état d'acétate, en présence d'ions $PO_4^{=}$ et en milieu acétique à pH 6,8, précipite totalement après 30 minutes les nucléotides puriques y compris DPN et TPN, mais les nucléosides et les bases ne sont pas précipités (128-129). A l'état de nitrate à pH 1,5-2, il a été utilisé pour précipiter les nucléotides de l'ARN (204) ; à l'état de chlorure (1,5 p. 100 dans l'acide trichloracétique 10 p. 100), il constitue le réactif de Mac Fayden (167) employé par divers auteurs pour précipiter les polynucléotides (225-258).

Mercure. — L'acétate mercurique (20 p. 100 en milieu acétique 0,1 p. 100) précipite quantitativement l'ATP tissulaire selon Kerr (128), mais 20 à 30 p. 100 seulement sont précipités si l'on élève la concentration acétique à 2 p. 100. Toutefois, par action conjuguée du froid, on peut dans ces conditions obtenir une précipitation quantitative de l'ATP (257) de l'AM_5P et de l'ADP (12-123) ainsi que des 4 mononucléotides constituants de l'ARN (209).

A température ordinaire, les nucléosides sont partiellement précipités par l'acétate mercurique (20) ou le sulfate (114) mais la précipitation est totale à 0°C. Kerr et Seraidarian (130) ont cependant signalé que si, dans le cas des extraits de cerveau, la plupart des nucléosides et bases puriques sont précipités avec les nucléotides, seuls ces derniers précipitent dans le cas des extraits de muscle.

A l'état de nitrate, et en milieu nitrique (réactif de Lohman) (159) le mercure a été également utilisé pour précipiter l'ATP (104-194). C'est par ce même réactif que Leloir et coll. (37-39) ont isolé d'un extrait alcoolique de levure, en même temps que les adénosine phosphates, les divers nucléotides dérivés de l'uridine 5' phosphate. A température ordinaire, le nitrate mercurique précipiterait complètement les nucléosides (114).

Autres métaux

L'Aluminium, à l'état de picrate (réactif de Buell) (35) a été signalé par Parker (204) comme précipitant quasi quantitativement les acides guanylique et adénylique mais non les nucléotides pyrimidiques de l'ARN.

Enfin le *Zinc* à l'état de sulfate, en conjugaison avec la baryte, précipite l'adénine et ses nucléotides mais non l'adénosine (237).

Alcalino-terreux

La baryte en présence de trichloracétate de calcium à pH 8,2-8,3 précipite ADP + ATP (123). Avec addition d'éthanol on précipite en même temps l'AM_5P, un repos prolongé au froid déterminant en outre la précipitation du DPN (216). On a également utilisé la baryte à pH II en présence de 2 volumes d'éthanol pour précipiter les nucléotides de l'ARN (18-61-92) et à pH 9 en présence d'éthanol pour précipiter l'UM_5P (39-202) et l'UDP (7).

A l'état d'acétate, le baryum à pH 6,8 précipite à 0°C et après 2 heures l'ATP et l'ADP (194). A pH 8, après 12 heures à 0°C en présence de 3 volumes d'éthanol, il précipite les nucléotides de l'ARN (115). L'acétate de baryum en présence d'éthanol à pH 8 a également été utilisé pour isoler l'UDP d'un extrait de levure (39).

Enfin, le *calcium* à l'état de chlorure, en présence d'un excès d'éthanol, a permis la précipitation des nucléotides libres d'un extrait alcoolique de levure fraîche (37).

II. — CONSTITUANTS NUCLÉIQUES

L'acide ribonucléique (ARN), qui fut à l'origine isolé de la levure sous le nom d'acide « zymonucléique », ne constitue pas le seul matériel nucléique des cellules. L'acide désoxyribonucléique (ADN), considéré initialement comme le type même des acides nucléiques animaux par le qualificatif de « thymonucléique », a pu être également identifié. Par l'emploi conjugué de méthodes histochimiques (29) et microspectroscopiques (45) il a été possible de localiser et de préciser la répartition des 2 types d'acides nucléiques dans la cellule de levure.

L'ADN, localisé dans le noyau, entre dans la constitution des chromosomes porteurs de gènes. L'ARN, qui est avant tout un constituant cytoplasmique, entre également pour une très faible part dans la composition du nucléole et des chromosomes.

A. — Teneurs des levures en acides nucléiques.

I. — Méthodes analytiques préconisées et résultats obtenus.

Parmi toutes les cellules vivantes, les levures constituent l'une des sources les plus abondantes d'ARN et de nombreux travaux ont eu pour objet la détermination quantitative de cet important composé cellulaire. Pour ce qui est de l'ADN, le nombre d'études est plus restreint, sans doute parce que l'ADN des levures, contrairement à la plupart des cellules animales, représente une fraction infime des acides nucléiques totaux. CHARGAFF et ZAMENHOFF (52) ont évalué à 0,044 p. 100 du poids humide, soit 0,15 p. 100 environ du poids sec, l'ADN extractible de la levure fraîche par ClNa.

Si l'on excepte les travaux déjà anciens de CLARK et SCHRYWER (57) et de BAUMANN (14) qui estimaient la teneur des levures en acide nucléique à 1,5-2,5 p. 100 du poids sec, les méthodes très diverses pratiquées au cours des 10 à 15 dernières années ont conduit à des résultats variant dans d'assez fortes proportions d'un auteur à l'autre. On en aura un aperçu à l'examen du tableau II sur lequel l'ensemble des travaux effectués dans ce domaine a été résumé.

TABLEAU II

Détermination quantitative des acides nucléiques des levures

MÉTHODES	PRINCIPE DES MÉTHODES UTILISÉES	RÉSULTATS OBTENUS		AUTEURS.	
		p 100 de levure (s.s)			
		ARN	ADN		
HISTOCHIMIQUE	Affinité des ribonucléoprotéines cytoplasm. p colorants basiques.	10	0,1	Jeener et Brachet (118.119.)	1942
PHYSICO-CHIMIQUES	Microspectroscopie du cytoplasme cellulaire en lumière U.V.	1 à 3		Caspersson et coll. (45.46)	1941
	Mesure de l'absorption à 260 mμ d'un extrait acide ou alcalin	3,2 à 7,6		Di Carlo et coll. (70.71)	1948?
BIOCHIMIQUES	①. Détermination chimique des bases puriques	2,42 à 6,33		Decker et Derr (67)	1944
	②. Détermination colorimétrique des pentoses				
	– par l'intermédiaire du furfurol			Brachet (29)	1941
	– ribose : phloroglucine - désoxyribose : Feulgen - Dische extraction des A.N. en milieu alcalin ppton à pH 7 (ARN) à pH 8 (ADN) p éthanol - acétate La	6,9 - 8,2	0,3	Euler et Hahn (86)	1947.48
	– ribose : orcine - désoxyribose : Dische Principe de Schneider (231 - 232) extract. trichloracétique	7 à 8,46	0,245 à 0,373	BOURDET et coll. (28)	1951
	③. Détermination colorimétrique du phosphore				
	– Principe de Schmidt-Thannhauser (228.226) (P et pentoses)	P nucléique (p 100 du P total)			
	– Principe de Schmidt-Thannhauser.	22		Juni et coll (121)	1948
	– Principe de Schmidt-Thannhauser (hydrolyse différentielle)	11-18		Ebel (83)	1952
	– Principe de Schneider : extract. perchlorique. à froid : ARN - à 70°C : (ARN + ADN)	P nucléique (mg) p 100 g lev s.s. 239,5 à 448,5	13,3 à 18,6	Ogur et coll (197)	1952

Bien qu'il participe à la composition de l'ARN au même titre que le ribose ou les bases azotées, le phosphore, dans le cas des levures, représente en fait le constituant le moins spécifique et les dosages d'acide nucléique reposant uniquement sur cet élément comme le prévoyait la technique originale de SCHMIDT et THANNHAUSER peuvent conduire à des résultats erronés. En effet, le matériel phosphoré acido-insoluble des levures, de nature principalement nucléique, comprend également 2 autres formes phosphorées non nucléiques dont il convient de tenir compte; la première de nature organique est représentée par les *phosphoprotéines* qui semblent être les constituants normaux de toutes les cellules vivantes; la seconde, de nature minérale, est constituée de *polyphosphates* dits « insolubles » que les levures peuvent accumuler dans certaines conditions.

2. — Importance des Phosphoprotéines.

La présence chez les levures d'une phosphoprotéine présentant les caractéristiques des phosphoprotéines animales et dénommée pour cette raison « zymocaséine » a été signalée en 1919 par THOMAS (252). La protéine isolée et décrite par l'auteur renfermait 16,15 p. 100 d'N et 1,8 p. 100 de P.

Plus récemment, en appliquant à la levure la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER, JUNI et coll. (121) ont estimé le phosphore protéique à 2 p. 100 du phosphore total, soit 0,03 p. 100 de la levure sèche.

3. — Importance des Méta et Polyphosphates « insolubles ».

La présence de métaphosphate chez la levure fut signalée pour la prmière fois par KOSSEL en 1893 (141). MAC FARLANE (166) puis WIAME (273) devaient montrer ultérieurement qu'une fraction de ce métaphosphate cellulaire n'est pas extraite en milieu acide à froid. On devait également préciser (226-272) que le matériel métachromatique pouvant être mis en évidence dans les cellules de levure par des réactions colorées histochimiques était de nature métaphosphorique et que la synthèse des substances basophiles observée par JEENER et BRACHET (119) serait due principalement à la formation de ce composé. EBEL (83) puis CHAYEN et coll. (53) ont par ailleurs indiqué que les composés décrits antérieurement comme métaphosphates devaient être considérés comme des polyphosphates.

Lors de la détermination des acides nucléiques, le métaphosphate « insoluble » est extrait avec ceux-ci à chaud par l'acide trichloracétique dans la méthode de SCHNEIDER ou à froid au cours de l'hydrolyse alcaline selon SCHMIDT-THANNHAUSER. Selon WIAME (274) l'acide trichloracétique à chaud et la soude à froid extraient respectivement

280 et 256 mg de P métaphosphorique « insoluble » par 100 g de levure (poids sec) préalablement appauvrie en phosphore.

Ogur et coll. (197) ont extrait le métaphosphate insoluble avec l'ARN et l'ADN par l'acide perchlorique 5 p. 100 à chaud (70°C) mais signalent que l'extraction peut être également réalisée à froid (0-4°C) en doublant la concentration de l'acide, l'ADN seul n'étant pas solubilisé dans ces conditions. Par hydrolyse de courte durée des extraits perchloriques obtenus à froid, on détermine le P métaphosphorique en tenant compte du P minéral libéré à partir de l'ARN dans les mêmes conditions (274).

Une autre technique de détermination des polyphosphates « insolubles » de la levure *T. utilis*) par hydrolyse différentielle a été proposée par Chayen et coll. (53) ; s'appliquant à des extraits trichloracétiques préparés selon Schneider, elle tient compte du fait qu'après 75 minutes à 90°C dans l'acide trichloracétique 5 p. 100 les polyphosphates minéraux libèrent 94 p. 100 de leur phosphore à l'état d'orthophosphate alors que dans les mêmes conditions l'ARN en libère seulement 15 p. 100.

Utilisant le fractionnement de Schmidt et Thannhauser, Juni et coll. (121) ont identifié 2 fractions phosphorées minérales distinctes : l'une, métaphosphorique, insoluble en milieu alcalin, l'autre pyrophosphorique, extractible par la soude, représentant respectivement 17 et 4 p. 100 du phosphore total de la levure. Ebel (83) a constaté que l'extraction sodique des polyphosphates suivie d'une précipitation barytique à pH 4,5, ne donne pas de résultats quantitatifs et a préféré une méthode d'hydrolyse différentielle permettant de déterminer respectivement le P nucléique et le P des polyphosphates.

La présence d'une fraction phosphorée minérale dans le matériel acido-insoluble des levures, à côté des constituants nucléiques, apparaît donc comme bien démontrée. Une certaine confusion semble néanmoins subsister sur sa nature, ses caractéristiques et son importance quantitative. Considérée comme méta ou polyphosphorique selon les auteurs, elle est signalée comme étant soit soluble, soit insoluble en milieu alcalin, non extractible ou extractible par les acides à froid. Ces divergences expérimentales rendent donc délicate la détermination quantitative de la fraction « méta ou polyphosphate insoluble » et les erreurs qu'elle peut comporter affectent directement le dosage des acides nucléiques lorsque celui-ci est fondé uniquement sur le phosphore.

On a émis de nombreuses hypothèses sur la signification et le rôle dans le métabolisme cellulaire des levures, de cette fraction phosphorée « insoluble ». On considère en général qu'elle est susceptible de constituer à la fois une réserve de phosphore et d'énergie (83-274) et qu'elle joue chez la levure le même rôle que le phosphagène des vertébrés (109). On a également envisagé l'hypothèse de sa liaison avec les protéines ou les

nucléoprotéines (83-126). Certains enfin sont d'avis que les polyphosphates « insolubles » seraient susceptibles d'intervenir dans la synthèse protéique aux côtés de l'acide ribonucléique auquel ils sont associés. (53)

B. — Composition nucléotidique de l'ARN.

1. — Résultats obtenus.

Ainsi qu'on peut le constater d'après le tableau III où a été groupé l'essentiel des résultats acquis au cours des dernières années, les très nombreux travaux qui ont eu pour objet l'analyse de l'ARN de levure font apparaître des variations importantes de composition entre les diverses préparations examinées.

TABLEAU III

Composition nucléotidique de l'ARN de levure isolé et purifié

AUTEURS	Crestfeld 1955 (62)	Wahhaus 1953 (269)	Crosbie et coll. 1953 (63)		Davidson et coll. 1952 (64)		Loring et coll. 1952 (162)		Deutsch 1952 (69)	Markham 1952 (180)	Boulanger 1951 (24)	Marshak 1951 (183)	Wyatt 1951 (276)		Smith 1950 (235)
	RAPPORT MOLÉCULAIRE (TOTAL = 4)														
AC. GUANYLIQUE	1,12	1,27	1,12	1	1,19	1,23	1,13	1,15	1,06	0,97	1,19	1,28	1,22	1,19	1,25
AC. ADÉNYLIQUE	1	1,03	0,98	0,91	0,95	1,07	1,03	1,08	1,08	1,15	0,97	1,12	1,04	1,02	1,03
AC. URIDYLIQUE	1,08	0,90	0,98	1,21	1	0,84	0,97	0,95	0,81	1,10	0,75	0,81	0,92	0,96	0,93
AC. CYTIDYLIQUE	0,80	0,80	0,93	0,87	0,85	0,86	0,88	0,82	1,03	0,78	1,08	0,80	0,82	0,83	0,80
AC. GUANYLIQUE / AC. ADÉNYLIQUE	1,12	1,23	1,15	1,09	1,24	1,15	1,09	1,06	0,97	0,84	1,23	1,14	1,17	1,17	1,20
AC. URIDYLIQUE / AC. CYTIDYLIQUE	1,35	1,13	1,05	1,40	1,18	0,97	1,11	1,17	1,28	1,41	1,44	1,02	1,12	1,15	1,17
PURINES / PYRIMIDINES	1,12	1,36	1,10	0,91	1,16	1,35	1,16	1,25	1,17	1,12	1,18	1,48	1,29	1,23	1,32

C'est ainsi que le rapport acide guanylique/acide adénylique est, selon les cas, supérieur ou inférieur à l'unité et oscille entre les valeurs extrêmes de 0,84 et 1,24. Mêmes constatations pour le rapport acide uridylique/acide cytidylique compris entre 0,97 et 1,44. Quant au rapport purines/pyrimidines, qui dans un seul cas est inférieur à l'unité (0,91), il ne manifeste pas davantage une constance puisque de 1,10 il peut s'élever jusqu'à 1,48.

Ces écarts dans les résultats expérimentaux tirent vraisemblablement leur origine de la diversité des méthodes mises en œuvre et plus particulièrement des conditions d'*extraction* et de *purification* de l'ARN ainsi que des *techniques d'analyse* elles-mêmes.

2. — Méthodes d'isolement.

Tous les résultats reproduits dans le tableau III ont été obtenus à partir soit de préparations commerciales analysées telles quelles (255) ou préalablement purifiées (24-63-64), soit de préparations effectuées dans les conditions les plus diverses par action de bases fortes (162), du chlorure de sodium (51), des sels de lanthane et de l'éthanol (269), des détergents (62) etc.

Plusieurs auteurs et en particulier Loring et coll. (162) ont signalé les risques de dégradation partielle de l'ARN lors de son isolement, dégradation pouvant résulter soit de l'action chimique éventuelle des divers réactifs utilisés, soit d'une action enzymatique, soit des deux à la fois.

Chargaff et coll. (49-51) avaient déjà signalé des différences de composition de l'ARN de levure d'une préparation à l'autre. Abrams (1) a constaté par ailleurs que le rapport guanine/adénine d'une préparation commerciale d'ARN est de 1, alors que le même rapport pour un échantillon préparé en évitant les conditions brutales de pH et de température est de 1,39.

Bien que la plupart des méthodes d'isolement pratiquées récemment aient pris soin de réduire au maximum les dégradations chimiques ou enzymatiques possibles, certains auteurs ont préféré éliminer les risques d'altération en opérant directement sur des extraits nucléiques bruts sans isolement préalable de l'ARN.

Voici la composition nucléotidique de l'ARN de levure telle qu'elle a pu être déterminée dans ces conditions par Thomas (253) puis Elson et Chargaff (84).

Rapports moléculaires.

	Total = 4						
	G	A	U	C	G/A	U/C	purines/pyrimidines
Thomas (253)	1,07	1,09	1	0,83	0,97	1,20	1,17
Elson-Chargaff (84)	0,98	1,02	1,1	0,90	0,97	1,20	0,997
	1,04	0,97	0,99	1	1,08	0,99	1,01

3. — Méthodes d'analyse.

De toutes les techniques mises en œuvre dans l'analyse quantitative de l'ARN,

— les *méthodes d'hydrolyse* chimique sont probablement celles qui exercent le plus d'influence sur les résultats ;

— les acides minéraux concentrés à haute température, qui hydrolysent l'ARN en bases, libèrent incomplètement l'uracile et la cytosine et désaminent les purines et la cytosine (111). L'acide formique à 175°C

(259) libère les 4 bases mais l'hydrolyse s'accompagne d'une perte de purines et de désamination ;

— l'ammoniaque sous pression à 145°C (156) libère les 4 mononucléotides, mais il y a en même temps formation de nucléosides et de bases et désamination.

Une modification des conditions expérimentales a néanmoins permis d'utiliser à des fins quantitatives les agents d'hydrolyse acides ou alcalins.

Smith et Markham (235) ont préconisé une hydrolyse de l'ARN en tube scellé par HCl IN à 100°C, méthode qui devait être ultérieurement pratiquée par de nombreux auteurs (27-63-133-162-253). Dans ces conditions, les 2 bases puriques et les 2 nucléotides pyrimidiques sont libérés, ces derniers subissant une légère dégradation en nucléosides dont il est tenu compte par correction (178). Dans les mêmes conditions l'acide sulfurique IN désamine environ 4 p. 100 de l'acide cytidylique (162).

L'acide perchlorique 12 N à 100°C libère après 1 heure les 4 bases constituantes de l'ARN. Proposé initialement par Marshak et Vogel (183) cet agent d'hydrolyse a été utilisé par d'autres chercheurs (276), mais Crosbie et coll. (63) ont signalé que les acides cytidylique et uridylique n'étaient pas hydrolysés quantitativement.

Boulanger et Montreuil (24) ont utilisé NH_3 concentré 8 jours à 45°C en tube scellé pour libérer quantitativement les 4 nucléotides ; les mêmes résultats ont été obtenus plus rapidement avec la soude (24-51-62-63) ou la potasse diluée à température ordinaire (64-69).

La séparation des produits d'hydrolyse a été le plus souvent réalisée par chromatographie sur papier uni (27-62-63-64-133-180-183-235-253-276) ou bi-dimensionnelle (24). Une technique d'ionophorèse sur papier a été appliquée avec succès à la séparation des 4 nucléotides libérés par hydrolyse alcaline (63-64-269). On a également pratiqué dans le même cas la chromatographie sur colonne (69). Loring et coll. (162) à partir d'un hydrolysat chlorhydrique d'ARN de levure, ont isolé les bases puriques par précipitation à l'argent, les nucléotides pyrimidiques étant par ailleurs transformés en nucléosides par action d'une phosphatase acide.

Quant à la détermination quantitative des produits séparés, elle a fait appel dans presque tous les cas à la spectrophotométrie. Certains auteurs ont cependant pratiqué un microdosage du phosphore des nucléotides séparés par ionophorèse (63-64) ou chromatographie sur papier (24).

LA DÉGRADATION DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE DE LEVURE

On ne possède pas actuellement de vue d'ensemble sur les phénomènes biochimiques mis en jeu dans la dégradation autolytique de l'ARN chez les levures. Quelques rares travaux ont fait état de certains produits

du catabolisme ribonucléique dans ces conditions. Diverses études ont par ailleurs été entreprises « in vitro » sur l'activité enzymatique manifestée par les levures vis-à-vis de certains composés puriques ou pyrimidiques. Nous allons examiner l'essentiel des travaux effectués en ce sens.

I. — LES PRODUITS DU CATABOLISME RIBONUCLÉIQUE CHEZ LES LEVURES AUTOLYSÉES

C'est par hasard que Salkowski (217) en 1889 constate la présence simultanée de xanthine et d'acides aminés dans le milieu de suspension d'une levure de boulangerie abandonnée un mois dans l'eau chloroformée. Parallèlement Schindler (220) montre que les cellules en suspension dans l'eau s'autolysent à température ordinaire en libérant adénine, guanine, hypoxanthine et xanthine. Un peu plus tard Kutscher et coll. (146-147) signalent la présence de quantités importantes de guanine et d'adénine dans des autolysats de levure, mais ne détectent les bases désaminées correspondantes qu'à l'état de traces. L'adénine devait d'ailleurs être isolée ultérieurement par Amberg et Jones (5) à partir d'autolysats de levure humide ou sèche, additionnée ou non d'acide nucléique. Navassart (193) constate d'autre part que la libération des bases puriques est très nettement inhibée par le formol 1 p. 100. Cette étude des bases puriques libérées au cours de l'autolyse devait être reprise ultérieurement par Meisenheimer (185) parallèlement à celle des acides aminés.

Mettant à profit les possibilités offertes par les méthodes modernes de chromatographie, nous avons nous-mêmes, en 1952, repris en détails l'étude qualitative des composés puriques et pyrimidiques libérés par les cellules de levure en cours d'autolyse (26). Des renseignements quantitatifs complémentaires, concernant les produits intermédiaires du catabolisme ribonucléique accumulés dans diverses conditions d'inhibition, ont été présentés l'année suivante dans une courte note (27). Une étude ultérieure de Vosti et Joslyn (263) devait montrer que l'excrétion du phosphore minéral au cours de l'autolyse est parallèle à celle de l'acide nucléique sans préciser davantage la nature des produits d'origine nucléique libérés et responsables de l'absorption ultra-violette observée.

II. — LES ENZYMES DU CATABOLISME RIBONUCLÉIQUE CHEZ LES LEVURES

On a groupé sous le terme générique de *nucléases*, les enzymes qui hydrolysent les acides nucléiques et leurs produits de dégradation. Le complexe enzymatique intéressant la dégradation des acides nucléiques polymérisés en mononucléotides et désigné par *nucléinase*, serait lui-même

constitué de 2 systèmes enzymatiques distincts : *dépolymérases et polynucléotidases*. Les *nucléotidases* effectuent d'autre part la déphosphorylation des mononucléotides en nucléosides, ces derniers subissant à leur tour l'action des *nucléosidases*. La dégradation des acides nucléiques s'accompagne en outre d'une libération d'ammoniaque résultant de l'action de *désaminases*. Mais on ne sait pas si la désamination précède, accompagne ou suit l'action des nucléotidases ou des nucléosidases.

On possède actuellement de nombreux renseignement sur les caractéristiques et les propriétés de diverses nucléases animales et végétales. Par contre, aucun travail faisant état de l'activité nucléasique des levures vis-à-vis de l'ARN n'a jusqu'à présent été entrepris.

Il est reconnu d'autre part que les levures peuvent présenter diverses activités phosphatasiques. Selon SHAFFNER et KRUMEY (219) la levure haute contiendrait 3 types distincts de phosphomonoestérases (250) :

— une phosphatase, non extractible par le glycérol mais présente dans le jus de macération, ayant sur la plupart des esters phosphates une activité optimum à pH 4 ;

— une autre phosphatase, extractible à la fois par l'eau et le glycérol, pouvant hydrolyser rapidement l'alpha-glycérophosphate et ayant un pH optimum de 6,4. Un enzyme du même type (pH optimum vers 6) a été signalé chez *T. utilis* par RAUTANEN et SUIROLA (210).

— enfin un 3^{e} type de phosphatase, thermostable, dont le pH optimum se situe en milieu alcalin.

Aucun fait expérimental n'a jusqu'à présent établi que l'une ou l'autre des phosphatases précédentes était susceptible de déphosphoryler spécifiquement les mononucléotides constituants de l'ARN. On semble considérer que les nucléotidases intervenant dans le catabolisme ribonucléique sont des phosphatases non spécifiques. Selon KAY (127) les nucléotidases seraient identiques aux phosphatases alcalines des tissus animaux.

Plusieurs travaux récents ont montré en revanche que les levures sont susceptibles d'exercer de façon spécifique vis-à-vis de certains dérivés nucléiques des activités nucléosidases et désaminases. Les faits actuellement connus dans ce domaine, y compris certaines hypothèses intéressant la dégradation des bases puriques et pyrimidiques, ont été rassemblés dans le tableau IV ci-contre.

Catabolisme des pentoses.

Les premiers faits expérimentaux relatifs au catabolisme des pentoses chez les microorganismes ont été rapportés par LUTWAK-MANN (165) : lors de la désamination de l'adénosine en hypoxanthine par des extraits cellulaires de *E. coli*, le ribose disparait du milieu. Sur le même organisme,

TABLEAU IV. — *Les enzymes du catabolisme ribonucléique chez les levures*

Type		NATURE DE L'ENZYME	LEVURES	MODE D'ACTION	MISE EN ÉVIDENCE	AUTEURS
NUCLÉOSIDASES	PRÉSENCE DE	Nucléoside phosphorylase	S. cerevisiae	dégrade inosine et guanosine p. phosphorolyse sans action s. xanthosine et adénosine Nucléoside + P ⟶ base + ribose P	Détermination des produits de la réaction par l'emploi conjugué de la spectrophotométrie et d'actions enzymatiques spécifiques.	Heppel-Hilmoë 1952 (105)
		Nucléoside hydrolase	S. cerevisiae	dégrade adénosine, inosine, guanosine et xanthosine sans intervention de P. Nucléoside + H_2O ⟶ base + ribose		
		Uridine-nucléosidase	S. cerevisiae	uridine + H_2O ⟶ uracile + ribose	spectrophotométrie différentielle	Carter 1951 (42)
	ABSENCE DE	Pyridine-nucléosidases	T. utilis		uridine et cytidine non assimilés pour croissance	Di Carlo et coll. 1951 (72)
DÉSAMINASES	PRÉSENCE DE	Ac. adénylique désaminase	T. utilis	$AM_3P + H_2O$ ⟶ $IM_3P + NH_3$ sans action s AM_3P, ADP, ATP.	assimilation substrat p. croissance	Di Carlo et coll. 1951 (72)
		Cytidine-désaminase	S. cerevisiae (lev. bière)	cytidine + H_2O ⟶ uridine + NH_3	spectrophotométrie différentielle	Wang et coll. 1950 (264)
		Cytosine-désaminase	S. cerevisiae (lev. boulang.) S. cerevisiae	cytosine + H_2O ⟶ uracile + NH_3	isolt uracile p. chromatog. s papier assimilation substrat p. croissance	Hahn-Haarmann 1926 (100) – Chargaff et coll. 1948-52 (50-143)
		Adénase	T. utilis	adenine + H_2O ⟶ hypoxanthine + NH_3	assimilation substrat p. croissance	Di Carlo et coll. 1951 (72)
		Guanase	T. utilis S. Cerevisiae	guanine + H_2O ⟶ xanthine + NH_3	– d° –	– Roush 1954 (214)
	ABSENCE DE	Ac. cytidyl et cytidine desam	T. utilis		substr. non assimilés p. croissance	Di Carlo et coll. 1951 (72)
OXYDASES ET AUTRES ENZYMES	PRÉSENCE DE	Hypoxanthine-oxydase	T. utilis	hypoxanthine + O_2 ⟶ xanthine	assimilation substrat p. croissance	Di Carlo et coll. 1951 (72) – Roush 1954 (214)
		Xanthine-oxydase		xanthine + O_2 ⟶ ac. urique		
		Uricase *		ac. urique + H_2O + O_2 ⟶ allantoïne		
		Allantoïnase	S. cerevisiae	allantoïne + H_2O ⟶ ac. allantoïque	besoins en biotine	Di Carlo et coll. 1953 (74)
		Allantoïcase		ac. allantoïque + H_2O ⟶ urée + ac. glyoxylique		
	SCHÉMA POSSIBLE		T. utilis S. Cerevisiae	uracile ⟶ (+2H) hydrouracile ; uracile ⟶ (+CO_2) ac. hydro-orotique ⟶ urée	assimilation substrat p. croissance	Di Carlo et coll. 1952 (75)

* absentes chez S. Cerevisiae (72)

Stephenson et Trim (240), observent que la vitesse de disparition du pentose est 10 fois plus rapide avec l'adénosine ou l'inosine qu'avec le ribose seul. Dickens (76) a constaté un phénomène identique avec des extraits cellulaires de levure en présence de ribose 5' phosphate et tenté de donner une explication du mécanisme enzymatique par lequel le ribose était dégradé. Le problème a été repris plus récemment par Sable (215) : la dégradation anaérobie du ribose 5'P par des extraits de levure se traduit par une disparition initiale très rapide du ribose, la réaction devenant ensuite plus lente pour s'arrêter totalement lorsque 85 p. 100 environ du pentose sont dégradés. Le dernier travail en date dans ce domaine a été présenté par Gibbs et coll. (91) dans une étude sur le catabolisme du ribose marqué (C_{14}) par des extraits de levure.

Divers mécanismes biochimiques concernant la dégradation des pentoses ont été proposés (76-91-142-215-239).

III. — LA DÉGRADATION DE L'ARN DE LEVURE « IN VITRO »

Si nos connaissances concernant les enzymes nucléasiques des levures et les étapes par lesquelles s'opère leur propre catabolisme ribonucléique demeurent fragmentaires, on possède par contre actuellement un ensemble important de travaux sur les divers modes de dégradation auxquels peut être soumis l'ARN de levure « in vitro » sous l'influence des systèmes enzymatiques les plus variés. Ce sont d'ailleurs des études de ce genre qui ont contribué pour une large part au développement de nos connaissances sur la structure des acides ribonucléiques. Et c'est sans doute en raison de sa forte concentration dans les cellules et de la facilité avec laquelle il peut en être extrait, que l'ARN de levure a constitué le plus souvent le substrat fondamental d'un très grand nombre de préparations enzymatiques.

Dans ces études de dégradation, la ribonucléase pancréatique a été et reste encore l'enzyme auquel on a fait le plus souvent appel. D'abord à l'état impur (pancréatine) (227) puis à l'état cristallisé (145), elle a maintes fois été utilisée seule. Mais souvent aussi son action a été complétée par d'autres systèmes enzymatiques tels qu'une nucléase extraite de la rate (106) ; des phosphomonoestérases acides ou alcalines isolées de sources très diverses : amandes douces (23), prostate (224-225), os (261), ou encore des phosphatases plus spécifiques comme la nucléotidase 3' de l'avoine (261). Une préparation enzymatique extraite de fèves de soja et présentant à la fois des activités phosphomonoestérase et ribonucléase a été également utilisée (221) de même que l'activité ribonucléasique d'extraits de champignons, (172) ou de feuilles (110).

On a également fait appel à certaines préparations, obtenues à partir des matériaux biologiques les plus divers, manifestant une activité

phosphodiestérase, le plus souvent doublée d'autres activités phosphatasiques.

L'extrait de muqueuse intestinale de veau préparé par ZITTLE (279) se comportait à la fois comme phosphodiestérase et phosphatase alcaline. Le venin de serpent, dont DELEZENNE et MOREL(68) avaient dès 1919 signalé l'activité nucléasique vis-à-vis de l'acide zymonucléique et qui devait être utilisé de nouveau à maintes reprises plus tard (60-97-98-261) présente, outre une activité phosphodiestérase, celle d'une nucléotidase 5'.

Action de la ribonucléase pancréatique.

Les travaux préliminaires relatifs à l'action de l'ARNase pancréatique sur l'ARN de levure ont conduit à des résultats apparemment opposés. Certains auteurs ont isolé des mononucléotides puriques et pyrimidiques (160) tandis que d'autres ont isolé des polynucléotides (3-87-145-227). On devait montrer ultérieurement que l'ARNase libère préférentiellement des mononucléotides pyrimidiques (25-43-132-161-179-224-225).

A la lumière des résultats les plus récents, il est possible de préciser que l'action prolongée de la ribonucléase pancréatique sur l'ARN de levure aboutit à 3 groupes différents de produits de scission :

a) Des mononucléotides de nature exclusivement pyrimidique, représentant 60 p. 100 environ des nucléotides pyrimidiques constituants de l'ARN et la presque totalité de l'acide uridylique. COHN et VOLKIN (59-261) ont démontré qu'il s'agissait de nucléotides 3'P. Ainsi la ribonucléase scinderait uniquement la liaison ester phosphate secondaire des nucléotides pyrimidiques 3'P et MARKHAM et SMITH (180) ont comparé l'action de l'enzyme à celle d'une phosphodiestérase pouvant rompre spécifiquement les liaisons ester phosphate des nucléotides pyrimidiques à l'exception de celle intéressant le C_3 du ribose.

b) Des polynucléotides dialysables de faible poids moléculaire constitués de di et trinucléotides de nature purique et pyrimidique. Cette fraction contient une forte proportion de l'acide adénylique total, une fraction plus faible de l'acide guanylique et de faibles quantités des acides uridylique et cytidylique.

c) Une fraction polynucléotidique non dialysable, constituée de tétra et penta nucléotides, et contenant la majeure partie de l'acide guanylique de l'ARN.

Action de la diestérase du venin de serpent.

Cohn et Volkin (60) ont montré que le venin de serpent brut présentant à la fois les activités d'une diestérase et d'une nucléotidase 5', hydrolyse la majeure partie de l'ARN de levure en nucléosides, P minéral, et diphosphonucléosides pyrimidiques.

En laissant agir seulement l'activité phosphodiestérase après élimination de l'activité 5' nucléotidase, 80 p. 100 environ des nucléotides de l'ARN sont libérés à l'état de nucléosides 5' phosphates, les autres produits de la dégradation étant formés en proportions équimoléculaires de nucléosides puriques et de diphosphonucléosides pyrimidiques, l'estérification intéressant les carbone 5 et 3 (ou 2) du ribose.

TRAVAUX PERSONNELS

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

I. — MATÉRIEL D'ÉTUDE

Dans notre travail expérimental nous avons fait appel à des levures d'origines très diverses, différant entre elles non seulement par le genre, l'espèce ou la variété, mais encore par l'état physiologique, fonction lui-même des conditions de nutrition et de développement.

Il s'est agi tantôt de cultures pures, tantôt de levures industrielles développées en présence ou en l'absence d'air sur des milieux de nature et de composition diverses : moûts de mélasses, de malt, de pommes ou de raisins. Dans les études d'autolyse les essais ont porté sur des cultures à l'état frais et dans les études de la composition qualitative et quantitative sur des cellules cryodesséchées.

Cultures pures.

3 levures ont été préparées à l'état de cultures pures dans les conditions suivantes :

1. — *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, cultivée en semi-aérobiose sur un moût stérile de mélasses de sucrerie enrichi en phosphate d'ammonium couvrant les besoins phosphorés et azotés des cellules.

2. — *Saccharomyces cerevisiae* Hansen var. *ellipsoideus*, cultivée avec forte aération sur milieu stérile à base de moût de raisin contenant par litre 1 g de phosphate d'ammonium et 2 g d'acide tartrique, les besoins en azote et en phosphore étant assurés.

3. — *Saccharomyces carlsbergensis*, cultivée en aérobiose sur milieu synthétique glucose-peptone pauvre en azote assimilable additionné de PO_4HK_2 à raison de 1 g/litre et de traces de Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{+++} fournis sous forme de sulfates.

En fin de culture, les levures sont séparées de leur milieu par centrifugation et lavées à plusieurs reprises avec de l'eau stérile.

Cultures industrielles.

Levures de vin.

4. — *Saccharomyces oviformis*, levures développées en anaérobiose au cours de la fermentation d'un moût de raisin vinifié en blanc sans SO_2, contenant par litre 210 g de sucres fermentescibles.

L'examen biologique des levures récoltées a mis en évidence la présence en quantités peu importantes de *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces bisporus*, appartenant à la flore naturelle du raisin ayant fourni le moût.

5. — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, levures récoltées après fermentation d'un moût de raisin vinifié en rouge préalablement sulfité puis ensemencé par la souche pure qui constitue l'élément biologique dominant du milieu.

6. — *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, levures récoltées dans les mêmes conditions que les précédentes après fermentation du même moût de raisin vinifié en rouge. Par contre, l'ensemencement du moût a été réalisé par la flore naturelle du raisin. S. *cerevisiae* var. *ellipsoideus* constitue la fraction majeure des levures récoltées ; un certain pourcentage de cette flore indigène est formé de levures apiculées telles que *Kloeckera apiculata* et *S. pastorianus* ayant échappé à l'action initiale de l'anhydride sulfureux.

Levure de cidre.

7. — *Saccharomyces carlsbergensis*, levures développées en anaérobiose après fermentation lente d'un moût de pomme contenant par litre 90 g de sucres fermentescibles. Une certaine fraction des levures récoltées est constituée de *S. microellipsoideus*.

Levures de distillerie.

8. — *Torulopsis utilis* (Henneb.) Loder, levures développées à partir d'un moût industriel à base de mélasses de sucrerie fortement aéré.

9. — *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, levures récoltées après fermentation d'un moût industriel à base de vinasses de betterave.

Levure de Brasserie.

10. — *Saccharomyces cerevisiae*-Hansen, levure basse développée à partir d'un moût de malt en fermentation au cours de la fabrication de la bière.

Levures de Boulangerie.

11 à 18. — *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, levures commerciales à fermentation haute, récoltées selon les procédés modernes de culture continue, à partir de moûts de mélasses fortement aérés, additionnés d'ammoniaque et de sels minéraux (phosphates).

Les échantillons 12 à 18 concernent des levures pressées fraîches à 70 p. 100 environ d'humidité, alors que l'échantillon n° 11, également destiné à la boulangerie, est une levure active à 10 p. 100 environ d'humidité, séchée par des procédés industriels.

Sitôt sa réception, chaque échantillon est abondamment lavé à froid à l'eau ordinaire puis à l'eau distillée et conservé à basse température (—2°C) pour une durée n'excédant pas 4 jours en attendant d'être expérimenté.

Cryodessiccation des levures.

Afin de permettre une conservation satisfaisante des échantillons jusqu'à leur analyse, tout en évitant les inconvénients d'un séjour prolongé au froid, une fraction de chacune des levures énumérées a été cryodesséchée. Ainsi se trouvent éliminées les inévitables transformations de nature enzymatique qui se manifestent encore à basse température chez les cellules intactes. Ce procédé présente en outre, sur les techniques de dessiccation usuelles faisant intervenir l'action de la chaleur, l'avantage de « fixer » le matériel cellulaire dans son état initial. Voici l'essentiel du mode opératoire utilisé :

— Dans un tube de verre de 70 cm^3 (d = 30 mm) muni à sa partie supérieure d'une allonge (d = 7 mm) on mesure 10 cm^3 d'une suspension aqueuse de levure contenant 1 g de matière sèche environ. La suspension est alors congelée vers —50 —60°C (mélange alcool-neige carbonique) après avoir été répartie en couche mince de 2 mm environ sur les parois internes du tube. Ce dernier est alors relié à un appareil en verre du type Campbell dans lequel on fait le vide (10^{-2} mm Hg environ). L'opération est terminée après 4 à 5 heures ; la levure cryodesséchée se présente sous l'aspect d'une poudre très fine adhérant aux parois et d'une teneur en eau de 3 à 4 p. 100. Les tubes sont alors scellés puis conservés en frigidaire.

II. — CONDITIONS D'AUTOLYSE DES LEVURES

La dégradation autolytique a été étudiée dans 2 conditions différentes :

— soit en laissant les cellules s'autolyser spontanément,

— soit en les mettant en présence d'effecteurs d'enzymes dont certains présentaient des propriétés antiseptiques ou antibiotiques.

A. — Autolyse spontanée.

Comme toute hydrolyse enzymatique poussée de matières protéiques, l'autolyse prolongée des levures risque de favoriser le développement de contaminations entraînant des phénomènes de putréfaction, bien que

divers travaux aient mentionné l'action bactériostatique ou bactéricide des cellules de levure vis-à-vis de certains microorganismes (137-256).

Il convenait donc avant tout de prévenir ou de limiter les formations microbiennes possibles sans affecter pour autant les systèmes enzymatiques mis en jeu par les levures au cours de la dégradation de leurs propres constituants cellulaires.

A cet effet, nous avons étudié l'influence exercée par de faibles concentrations d'antiseptiques et d'antibiotiques à la fois sur le développement éventuel de microorganismes et sur l'activité autolytique des cellules de levure. Nous avons pris comme critère de cette activité la quantité d'ions $PO_4^{\equiv}$ libérés par les cellules ainsi traitées en la comparant aux cellules témoins autolysées dans les mêmes conditions.

a) Emploi des antiseptiques et des antibiotiques.

Antiseptiques.

Si l'on excepte le chlore et certains métaux comme le cuivre et le cadmium (271), les cellules de levure passent pour être les mieux armées contre la plupart des agents antiseptiques : en présence de formol, à la concentration de 1 g/litre, les cellules conservent leurs propriétés vitales (205). De même, dans un milieu contenant 5 mg/litre de certains sels d'ammonium quaternaires (bromure de cétylpyridinium) l'activité fermentaire est conservée alors que le développement des bactéries acétiques est bloqué (138). Par contre, aux concentrations plus élevées, l'action bactéricide de ces composés affecte les cellules de façon marquée : à la concentration de 100 mg/litre le cétavlon (bromure de cétyltriméthylammonium) inhibe la respiration des levures et provoque en même temps la diffusion dans le milieu des constituants protoplasmiques (260).

D'une façon générale les antiseptiques, qui s'opposent au développement des bactéries et des moisissures, ne sont d'ailleurs pas forcément des inhibiteurs de diastases puisque l'on peut conserver des préparations enzymatiques en présence de composés tels que le toluène, le chloroforme, le crésol, le thymol, sans modifier leur action. Toutefois, divers travaux ont signalé l'influence exercée par des antiseptiques de ce type sur l'autolyse des levures (99-173-193-242-263).

Nous avons constaté personnellement que l'addition de thymol, chloroforme ou toluène à des suspensions aqueuses de levure commerciale de boulangerie à 40 mg de matière sèche/cm³ abandonnées à 37°C inhibait effectivement le développement des microorganismes mais déterminait une plasmolyse des cellules comme l'indiquent les résultats suivants :

	Témoin	+ 2 p. 100 sol. saturée thymol	+ 2 p. 100 chloroforme	+ 2 p. 100 toluène
P libéré après 4 jours à 37°C (p. 100 du témoin)..	100	131	171	185

D'autres essais, effectués en présence de 2 composés à action antiseptique : les paraoxybenzoate de méthyle (POBM) ou de propyle (POBP), utilisés à raison de 15 mg/100 cm³ de suspension, ont mis en évidence que la vitesse d'autolyse n'était pas modifiée mais que le développement des microorganismes n'était pas davantage inhibé après une digestion prolongée à 37°C.

Antibiotiques.

D'une façon générale, les levures résistent bien aux antibiotiques classiques et divers travaux ont mentionné le degré de sensibilité des cellules en fonction de la concentration en antibiotique.

Selon HESSELTINE et coll. (108), les levures ne sont sensibles à l'auréomycine qu'à des concentrations supérieures à 500 mg/litre et l'addition de l'antibiotique à raison de 25 à 50 mg/litre de milieu facilite l'isolement des levures dans les échantillons fortement pollués par les bactéries. On a en effet signalé qu'à la concentration de 50 mg/litre la pénicilline, l'auréomycine, la streptomycine (205) sont sans action sur l'activité fermentaire des levures, et qu'une concentration pouvant atteindre jusqu'à 2,5 g/litre exerce une action inhibitrice peu marquée (116). STRANDSKOV et coll. (243) ont indiqué récemment que la contamination microbiologique de la bière lors de la fermentation est inhibée par la terramycine et l'auréomycine à raison de 50 mg/litre ; avec la streptomycine, il faut une concentration supérieure à 125 mg/litre pour obtenir le même résultat alors qu'un nouvel antibiotique, la polymyxine, est efficace à 5 mg/litre. Aux concentrations indiquées la multiplication cellulaire des levures n'est pas affectée.

Compte tenu des observations précédentes, voici les résultats qui ont été obtenus en soumettant à l'autolyse une levure commerciale de boulangerie en suspension aqueuse contenant 40 mg poids sec/cm³ en présence de 3 antibiotiques différents à la concentration de 50 mg/litre :

	Témoin —	+ pénicilline —	+ streptomycine —	+ auréomycine —
P libéré après 7 jours à 37°C (p. 100 du témoin).....	100	95	95	90

L'addition d'antibiotiques à la concentration utilisée ne modifie donc pas de façon appréciable l'activité autolytique des levures. Malheureusement elle ne se révèle pas davantage efficace vis-à-vis des autres microorganismes, car l'examen microbiologique des autolysats met en évidence une contamination non négligeable.

Association antibiotiques-antiseptiques.

BEAUNE et PERIAT (15) ont signalé qu'il était possible d'effectuer, sans contamination, des digestions enzymatiques de matières protéiques

pouvant atteindre une durée de 10 jours à 40°C en associant un antiseptique volatil (chloroforme) et 2 antibiotiques(pénicilline et streptomycine).

Nous avons donc procédé à des essais d'autolyse à 37°C en additionnant la suspension aqueuse de levure examinée (40 mg poids sec/cm^3) du mélange chloroforme (4 p. 1000) pénicilline (7 mg/litre) streptomycine (100 mg/litre) préconisé par les précédents auteurs.

Les résultats montrent que dans ces conditions l'évolution du phosphore libéré n'est pas modifiée et que l'association chloroforme-antibiotiques est sans action appréciable sur l'activité enzymatique des levures.

P ortho libéré p. 100 du P total de la levure.

	2 jours	5 jours	10 jours
après			
témoin	32	47	87
+ $CHCl_3$ — antib	35	50	83

On constate par ailleurs que jusqu'au 6^e jour d'autolyse, la suspension additionnée du mélange antiseptique-antibiotiques, comparée à la suspension témoin, n'est pratiquement pas contaminée. Par contre, au 10^e jour on dénombre, pour 100 cellules de levure, 20 contaminations dans le premier cas et 14 seulement dans l'autolysat témoin. L'action antiseptique-antibiotique ne demeure donc pas efficace jusqu'aux derniers stades de l'autolyse et en ce sens, l'emploi de l'association antibiotiques-chloroforme ne semble pas présenter un avantage particulier.

b) **Conditions expérimentales.**

Les observations précédentes montrent qu'il est bien difficile lorsque l'activité autolytique des levures ne doit pas être modifiée, d'inhiber en totalité les développements microbiens dans ce milieu de culture par excellence que constitue un autolysat de levure.

L'emploi de cultures pures et l'adoption de conditions expérimentales rigoureuses ont cependant permis (sans parvenir toutefois à le supprimer totalement) de limiter suffisamment le développement des contaminations pour permettre une étude valable du catabolisme ribonucléique jusqu'aux stades les plus avancés de l'autolyse.

Ajoutons d'ailleurs qu'il a été possible, même en partant de cultures industrielles de pureté biologique suffisante (levures de boulangerie) et à condition de respecter les conditions expérimentales qui vont être décrites, de prolonger suffisamment la durée d'autolyse sans qu'il y ait contamination massive des autolysats.

Le mode opératoire suivant a donc été appliqué indistinctement aux levures provenant de cultures pures comme de cultures industrielles.

Dans un tube stérile de centrifugeur les cellules sont lavées 3 fois

successives à l'eau stérile glacée puis remises en suspension dans un volume connu d'eau froide également stérile. On prélève alors stérilement une partie aliquote de la suspension bien homogène pour dosage de la substance sèche sur sable à l'étuve à 102°C. Celle-ci étant déterminée, on dilue la suspension mère de façon à obtenir une suspension contenant 1 g de matière sèche par 10 cm^3. On transvase alors aseptiquement le contenu bien homogénéisé du tube dans un erlen stérile bouché au coton et renfermant quelques billes de verre. L'emploi d'un flacon à fond large et plat ainsi que les billes de verre permet, lors de chaque prélèvement ultérieur, une homogénéisation satisfaisante de la suspension, avantage que ne présente pas le tube de centrifugeur.

On prélève une nouvelle fois à la pipette stérile une partie aliquote de la suspension (alors vers 15-20°C) en vue d'en effectuer l'examen microbiologique, d'établir la composition de la levure non autolysée et de vérifier la concentration en substance sèche de la suspension définitive. L'erlen, recouvert d'un capuchon en matière plastique, est déposé dans une étuve réglée à 37°C±0,1 et saturée en vapeur d'eau. Dans ces conditions tout risque d'évaporation est évité et la concentration en levure de la suspension demeure constante lors du séjour prolongé à l'étuve.

On laisse la levure s'autolyser ainsi pendant une durée variable selon les conditions de l'expérience, pouvant atteindre dans certains cas 7 à 8 jours et même 10 à 12 jours. La suspension est agitée à intervalles réguliers et les prélèvements en vue des déterminations chimiques et microbiologiques, sont effectués de 24 h en 24 h à la pipette stérile et en prenant soin d'éviter toute contamination extérieure.

c) **Examen microbiologique des autolysats.**

Le dénombrement des cellules de levure a été effectué soit par cultures sur milieu gélosé à base de malt (pH 7) soit par numération au microscope à l'aide de l'hématimètre de Malassez.

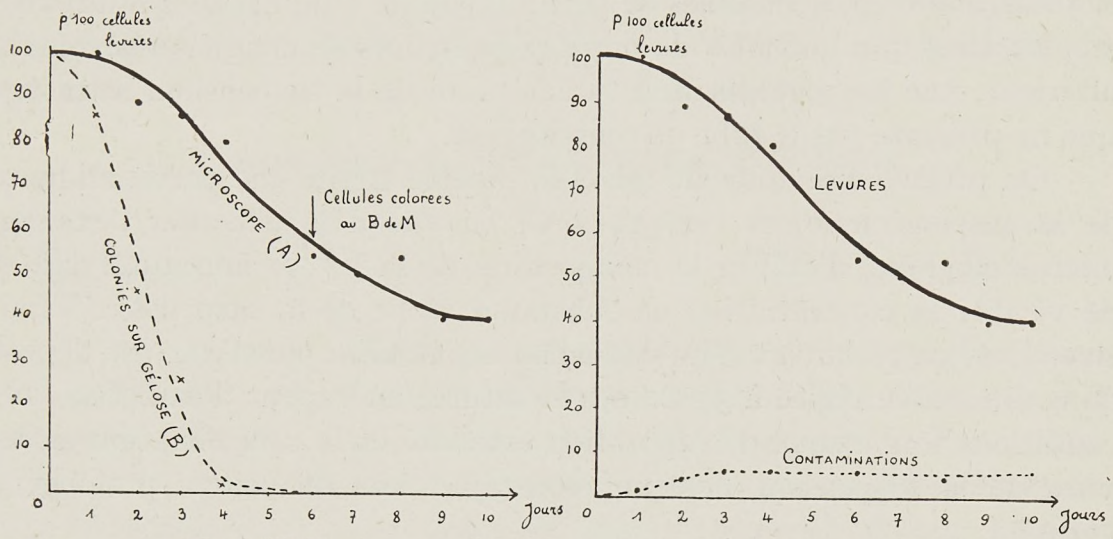
Le dénombrement des cellules mortes a été effectué en présence de bleu de méthylène en solution tamponnée, selon la technique de Kink et Kules décrite par Dayharsh (66).

Le dénombrement des microorganismes de la contamination(bactéries) a été effectué par ensemencements sur boîtes de Pétri sur un milieu malt-gélose à base d'actidione : dans ces conditions le développement des levures est inhibé et seules prolifèrent les bactéries.

On a trouvé que 10 cm^3 de suspension de levures équivalant à 1 g de matière sèche contenaient, avant l'autolyse et selon les cultures, un nombre de cellules compris entre 22×10^9 et 35×10^9.

Levures.

Au cours de l'autolyse, l'examen au microscope révèle une diminution du nombre total des levures de la suspension jusqu'à une valeur constante atteinte vers le 9e jour représentant environ 40 p. 100 des cellules initiales (Fig. 1, gr. 1, courbe A). Même aux stades les plus avancés, la taille des cellules reste inchangée ; par ailleurs, les cellules entièrement



GRAPHIQUE 1
DÉNOMBREMENT DES LEVURES AU COURS DE L'AUTOLYSE

GRAPHIQUE 2
ÉVOLUTION DES CONTAMINATIONS AU COURS DE L'AUTOLYSE

FIG. 1

colorées et pouvant être considérées comme mortes n'apparaissent qu'au 6e jour et représentent seulement 2 p. 100 des cellules totales au 9e jour. C'est également à partir du 6e jour d'autolyse que seul le noyau des autreé cellules fixe le colorant alors que le protoplasme demeure non colors. Il semble donc qu'au cours des 6 premiers jours les levures, dont le nombre décroît, conservent certains aspects de leur activité vitale si l'on considère leur comportement vis-à-vis du bleu de méthylène.

Ces conclusions ne s'appliquent plus si l'on examine les résultats fournis par les dénombrements sur boîtes de Pétri. Après 2 jours on trouve que 45 p. 100 des cellules initiales ont conservé leur pouvoir de multiplication, 25 p. 100 après 3 jours et 2 p. 100 seulement après 4 jours, les dénombrements ne donnant pas de valeurs significatives après 6 jours (Fig. 1, gr. 1, courbe B). Bien qu'elles traduisent un phénomène évoluant dans le même sens, ces constatations ne s'accordent pas avec les observations rapportées par VOSTI et JOSLYN (263) selon lesquelles lors de l'autolyse à 34°C d'une suspension de levure dans un tampon citrate 0,5 M, 8 p. 100 seulement des cellules restent viables après 24 h et 6 p. 100 après 48 h. Il est vraisemblable que la nature du milieu de suspension exerce une action non négligeable dans ces phénomènes.

Nos observations concernant la taille des cellules de levure au cours de l'autolyse vérifient d'autre part les constatations antérieures de STRAIN (242) et de VOSTI et JOSLYN (263) signalant que la forme des cellules autolysées demeure inchangée.

Contaminations.

Si on trace, en fonction du temps, la courbe d'évolution des contaminations apparues dans l'autolysat par rapport aux cellules de levures dénombrées au microscope, on constate que le nombre de cellules étrangères aux derniers stades de l'autolyse ne constitue pas plus de 6 p. 100 des cellules de levure présentes à l'origine lorsque l'on part d'une culture pure (Fig. 1, gr. 2).

Si on exprime le nombre de contaminations par rapport aux levures présentes à un stade donné de l'autolyse, les proportions sont évidemment plus élevées mais restent de l'ordre de 14-15 p. 100 ; elles peuvent atteindre 20 p. 100 s'il s'agit de levures cultivées industriellement. Même aux tous derniers stades, il y a donc prédominance marquée du nombre des cellules de levure ; mais du fait que ces cellules ne sont plus viables, il faut surtout tenir compte de l'importance quantitative des systèmes enzymatiques qu'elles ont libéré dans le milieu.

En conclusion, vouloir réaliser une autolyse très poussée des cellules de levure dans des conditions d'aseptie totale et sans faire appel à des antiseptiques ou des antibiotiques, apparaît donc comme une impossibilité, même en partant de cultures pures. Ce qui demeure néanmoins réalisable, c'est de limiter notablement le développement des microorganismes et d'éliminer ainsi dans de très fortes proportions les actions enzymatiques secondaires.

Il s'agissait pour nous de faire une étude valable du catabolisme ribonucléique par les enzymes propres aux cellules de levure et nous pensons avoir satisfait aux impératifs qu'impliquait cet objectif en opérant dans les conditions qui viennent d'être exposées.

d) Autolyse à divers pH.

L'étude de l'autolyse spontanée des cellules à divers pH et dans des temps prolongés a présenté certains obstacles. Le très fort pouvoir tampon des divers constituants cellulaires libérés au cours de l'autolyse a rendu en effet très difficile le maintien des pH extrêmes jusqu'au stade final de la dégradation, le pH des autolysats évoluant dans des limites très étroites de 5,5 à 6,5 selon les levures. D'une manière générale, les suspensions aqueuses de levure préparées stérilement ont été centrifugées et l'eau de suspension a été remplacée par un volume égal de la solution tampon préalablement stérilisée.

Des essais préliminaires, effectués sur des suspensions à une concentration en levure de 40 mg (poids sec)/cm³, ajustées aux pH désirés par des solutions acide (HCl, 0,2N) ou alcaline (NaOH, 0,1 N) avant le début de l'autolyse, ont montré qu'il était impossible de maintenir les valeurs de pH initiales jusqu'à la fin de l'expérience. De meilleurs résultats ont été obtenus en réajustant toutes les 12 heures le pH des suspensions en cours d'autolyse par les mêmes solutions acide ou alcaline, mais de telles conditions ne permettaient pas le maintien de la stérilité des milieux.

Pour des concentrations identiques en levure (40 mg/cm³) le pouvoir tampon de diverses solutions (phtalate, succinate, acétate, glycocolle, véronal) utilisées à des concentrations de 0,01 M et même 0,1M s'est révélé manifestement insuffisant. Il a fallu diminuer de 10 fois la concentration en levure des suspensions examinées pour que les solutions tampon à la concentration 0,1M puissent maintenir correctement les valeurs de pH initiales jusqu'au terme de l'autolyse. Nous indiquons ci-dessous la nature des solutions tampon qui ont été retenues dans cette étude ainsi que leurs zones respectives d'utilisation.

pH	nature du tampon
2 à 6	phtalate 0,1 M
3 à 8	véronal-acétate 0,1 M
4 à 7	acétate-malate-glycocolle 0,1 M (248)
7 à 10	T R I S 0,1 M (1–3 propanediol–2 amino–2 hydroxyméthyl).

A la concentration en levure indiquée (4 mg/cm³) et avec les solutions tampons précédentes, le pH des autolysats est rigoureusement maintenu jusqu'au stade le plus poussé de l'autolyse, les seules variations observées se produisant aux pH extrêmes et ne dépassant pas 0,5 unité pH. Nous avons en outre vérifié que la nature du tampon utilisé était sans action sur la libération de l'ortho-phosphate, les mêmes valeurs étant obtenues à un pH donné avec des tampons de nature différente.

B. — Autolyse en présence d'effecteurs d'enzymes.

Les risques de contamination que comporte l'autolyse spontanée et prolongée des cellules de levure disparaissent dès l'instant où le phénomène de dégradation se déroule en présence d'effecteurs enzymatiques lorsque la concentration de ces derniers présente une action antiseptique ou antibiotique marquée.

Les expériences ont cependant été effectuées à partir d'une culture pure avec les précautions d'aseptie décrites précédemment. Nous avons fait appel à des effecteurs enzymatiques de nature très diverse dont certains, tels que le cyanure, le fluorure, l'arséniate, le formol, les ions Cu^{++}, Ag^{+}, Hg^{++}, se comportent en même temps comme antiseptiques, alors

que d'autres (ions Mn^{++}) ne présentent pas d'action particulière vis-à-vis des contaminations microbiennes. Compte tenu de ce que l'on sait sur l'action de ces composés à l'égard des cellules de levure et des microorganismes, les concentrations ont été choisies telles que le catabolisme normal des levures en soit affecté.

C'est ainsi que les sels d'ammonium quaternaire tels que le bromure de cétyltriméthylammonium (cetavlon) sont bactériostatiques aux faibles concentrations (de 10 à 20 mg/litre) mais sans action appréciable sur les levures, alors qu'aux concentrations élevées (de 0,1 g à 2 g/litre) ils sont bactéricides mais inhibent en même temps fortement l'activité des levures (138). Nous avons déjà fait état par ailleurs de l'influence des antibiotiques et de leur concentration sur l'activité des levures et des microorganismes.

En résumé, nos conditions expérimentales ont été les suivantes :

On prépare, dans les conditions précédemment décrites, une suspension de levure contenant en poids sec 1 g/10 cm^3. A l'aide de pipettes stériles, on prélève des fractions de 20 cm^3 de la suspension bien homogène que l'on répartit dans une série d'erlens de 50 cm^3, contenant quelques billes de verre, bouchés au coton et stérilisés au préalable à l'autoclave. Le contenu de chaque erlen est additionné d'un certain volume de la solution de l'effecteur également stérilisée si nécessaire (cas des ions Mn^{++}) et tel qu'il réalise la concentration désirée ; l'ensemble des suspensions de levure ainsi préparées est mis à autolyser à l'étuve à 37°C en même temps que la suspension témoin, dans les mêmes conditions que celles décrites pour l'autolyse spontanée. Des prélèvements permettant de suivre l'évolution de l'autolyse sont effectués de 24 h en 24 h et l'expérience est arrêtée en conséquence à un certain stade, chaque erlen étant mis au froid (—4°C environ) en attendant d'entreprendre les analyses décrites par ailleurs.

Voici les divers effecteurs qui ont été utilisés dans nos essais et leur concentration finale respective dans la suspension abandonnée à 37°C :

— Métaux : tous ont été utilisés à l'état de chlorures à l'exception de Ag (nitrate): Co^{++}, Mn^{++}, Hg^{++} 0,01M. Ag^{+} et Cu^{++} 0,1M.

— Inhibiteurs du métabolisme — utilisés à l'état de sels de sodium ;

fluorure, cyanure 1M.

nitrure, arséniate, arsénite, monoiodacétate 0,1M.

— Réducteurs :

cystéine 0,2M, sulfure de Na 0,1M environ, formol 0,5 p. 100.

— Autres composés :

bromure de cétyltriméthylammonium (cetavlon) 0,1 p. 100, 2-4 dinitrophénol 0,01M.

— Antibiotiques :

Un poids déterminé de l'antibiotique a été déposé directement dans

l'erlen préalablement stérilisé de façon à réaliser une concentration finale de 0,2 p. 100. La pénicilline et la strptomycine (sulfates) provenaient de la Société Sofrapen, l'auréomycine (chlorhydrate) des Etablissements Rhône-Poulenc.

III. — FRACTIONNEMENT DES CONSTITUANTS CELLULAIRES

Le principe de fractionnement utilisé dérive directement des techniques analytiques proposées en 1945 par SCHMIDT et THANNHAUSER (228) et SCHNEIDER (231) et adaptées depuis à une grande variété de matériaux biologiques. Il consiste à extraire les constituants cellulaires acido-solubles par un réactif précipitant les protéines (acides trichloracétique ou perchlorique) puis le matériel lipidique par les solvants classiques. On isole en définitive la fraction protéique insoluble des cellules contenant les acides nucléiques.

Appliquée aux levures intactes, cette méthode a également permis, dans le cas des cellules autolysées, de séparer de la fraction cellulaire non dégradée les produits acido-solubles de la dégradation ribonucléique.

A. — Constituants acido-solubles.

a) Extraction et Isolement.

Extraction.

Les levures fraîches ont été extraites dans certains cas directement après avoir été mises en suspension dans l'eau, soit le plus souvent après avoir été cryodesséchées. L'extraction des levures à des stades divers de l'autolyse a toujours été pratiquée sur des suspensions de concentration connue en matière sèche.

Dans un tube de centrifugeur de 35 cm³ on pèse un poids de levure ou mesure un volume de suspension (20 cm³) tel qu'il correspond à 2 g de matière sèche. On ajoute alors 25 cm³ d'acide trichloracétique (ATC) 10 p. 100 pour les levures cryodesséchées, ou 5 cm³ du même acide à 50 p. 100 dans le cas des suspensions, les réactifs étant utilisés glacés. Les cellules sont mises en suspension et on laisse en contact au froid pendant 1 heure en agitant fréquemment.

Après centrifugation à —10°C, on décante l'extrait acido-soluble dans une fiole jaugée de 100 cm³. L'insoluble est traité de nouveau 2 fois par 15 à 20 cm³ d'ATC 10 p. 100 glacé, puis 1 fois par 15 cm³ d'ATC 1 p. 100 avec centrifugation immédiate à —10°C, les extraits acides étant réunis ; on procède enfin à 2 lavages de l'insoluble par l'eau glacée (10 cm³) en les joignant par décantation aux extraits acides. On ajuste alors à 100 cm³ ;

les constituants acido-solubles extraits de 1 g de levure (poids sec) sont ainsi contenus dans 50 cm^3 de liquide trichloracétique.

Sur cet extrait on procède alors aux déterminations quantitatives suivantes : P total, P ortho, ribose, ainsi qu'à l'isolement des composés puriques et pyrimidiques.

Isolement.

Afin de pouvoir effectuer la séparation chromatographique et la détermination quantitative individuelle des composés puriques et pyrimidiques acido-solubles, il s'est révélé indispensable de concentrer fortement les extraits obtenus. Une concentration directe par élimination de la solution trichloracétique ne pouvait être envisagée en raison de la labilité de certains constituants en milieu acide ; nous avons donc tenté d'isoler ces composés par l'intermédiaire des complexes qu'ils sont susceptibles de former avec les métaux lourds, après avoir examiné dans quelles conditions il était possible d'obtenir leur précipitation quantitative.

b) Précipitation comparée par les sels de mercure, de plomb et d'argent.

Il est apparu assez difficile, à la lumière des travaux précédemment exposés ayant utilisé les métaux lourds ou le baryum, de dégager une méthode permettant de précipiter quantitativement un mélange complexe de nucléotides de nucléosides et de bases. Nous avons déjà signalé les divergences constatées selon la nature de l'acidité ou de l'alcalinité du milieu de précipitation pour un même métal, et même selon la nature du matériel biologique étudié. Aussi avons-nous jugé préférable d'effectuer une étude systématique des conditions permettant, selon la nature de l'agent utilisé, une précipitation quantitative des constituants cellulaires acido-solubles des levures.

Des essais préliminaires avec le baryum à l'état de baryte ou d'acétate, dans des conditions diverses de pH, ont mis en évidence l'impossibilité de précipiter à la fois et quantitativement les 4 nucléotides de l'ARN ainsi que les nucléotides libres et leurs dérivés nucléosides ou bases. Certains essais, faisant intervenir la précipitation en présence de concentrations variées en alcool, ont semblé conduire à des résultats plus satisfaisants, mais ont été abandonnés en raison des difficultés d'ordre expérimental qu'ils impliquaient par suite de la mise en œuvre de volumes trop importants.

La méthode la plus profitable nous a semblé être celle faisant intervenir les sels de mercure, d'argent ou de plomb qui, à des titres divers, sont signalés comme des précipitants des nucléotides, nucléosides et

bases. Nous avons d'abord constaté que la précipitation en milieu acide des mononucléotides de l'ARN, et plus particulièrement des nucléotides pyrimidiques, par l'acétate ou le nitrate mercurique ou l'acétate de plomb, n'était jamais quantitative, mais qu'il était possible de précipiter totalement ou en partie la fraction restante en alcalinisant le milieu. Avec le nitrate d'argent en milieu alcalin, la précipitation des nucléotides pyrimidiques de l'ARN n'était pas davantage quantitative, contrairement à celle des 2 nucléotides puriques.

Voici le mode opératoire qui a été utilisé à l'aide de divers sels de mercure, d'argent ou de plomb en faisant varier d'une part le pH, d'autre part la nature de l'acidité ou de l'alcalinité du milieu de précipitation.

A partir d'une levure fraîche (levure de brasserie en phase de croissance active) on extrait les constituants acido-solubles dans les conditions exposées plus haut. L'extrait trichloracétique est additionné de quantités connues de nucléotides, nucléosides et de bases puriques et pyrimidiques dans les conditions suivantes :

— les 4 nucléotides sont préparés à partir d'un hydrolysat alcalin d'ARN commercial ; les nucléosides sont apportés à l'état pur, les bases sous forme d'un hydrolysat formique d'ARN (259).

Le mélange complexe ainsi obtenu (400 cm^3) est réparti en 7 fractions de 50 cm^3 dans une série de tubes de centrifugeur, numérotés de 1 à 7, placés dans un bain de glace, chaque fraction correspondant à 1 g sec de levure initiale.

Le contenu des tubes 1, 2, 3 et 6 est amené à pH 6,5 par la soude, celui du tube 7 au même pH par l'ammoniaque. D'autre part, on alcalinise à pH 8,3 le contenu du tube 4 par la soude, celui du tube 5 par l'ammoniaque. L'ajustage au pH désiré est fait au papier indicateur en prenant soin de maintenir les extraits à basse température. La précipitation est alors effectuée par les réactifs suivants :

1. — Acétate mercurique 20 p. 100 dans l'acide acétique 2 p. 100. Le pH de l'extrait, initialement à 6,5 est abaissé à 4,8.

2. — Acétate mercurique préparé à partir d'oxyde jaune de mercure selon Caputto et coll. (39) ; l'extrait de pH 6,5 est acidifié à pH 3,5 par l'acide nitrique avant l'addition du réactif.

3. — Nitrate mercurique (réactif de Lohman) ; l'addition du réactif (0,5 cm^3) porte le pH de 6,8 à 2.

4. — Nitrate d'argent 1M (milieu sodique pH 8,3).

5. — Nitrate d'argent 1M (milieu ammoniacal pH 8,3).

6. — Acétate neutre de plomb 20 p. 100 (pH 6,5 neutralisation sodique).

7. — Acétate neutre de plomb 20 p. 100 (pH 6,5 neutralisation ammoniacale).

La précipitation totale des extraits est obtenue avec 3 cm^3 de chacun

des réactifs précédents à l'exception du réactif de LOHMAN plus concentré. Les tubes sont alors déposés au froid pendant une nuit. On centrifuge alors à —10°C après s'être assuré qu'aucun précipité ne se forme par addition d'une ou deux gouttes de réactif. Les liquides surnageants sont décantés dans une nouvelle série de tubes de centrifugeur. Chaque précipité est lavé 2 fois par le réactif de précipitation dilué au 1/40e, puis conservé à basse température.

Les liquides recueillis à partir des tubes 1, 2, 3, 6 et 7 sont alors alcalinisés soit par la soude (nos 1, 2, 3, 6) soit par l'ammoniaque (no 7) à pH 8,3-8,5. Par suite de l'excès de réactif, l'alcalinisation détermine la formation d'un nouveau précipité constitué pour une part de l'hydroxyde correspondant, (précipité blanc finement divisé) et des composés puriques et pyrimidiques non précipités en milieu acide (précipité jaunâtre floconneux). On ajoute alors goutte à goutte chaque réactif jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de précipité, ce dernier étant ensuite centrifugé et lavé comme précédemment.

En ce qui concerne les liquides surnageants des tubes 4 et 5, obtenus après précipitation argentique en milieu alcalin, leur acidification par SO_4H_2 ne donne lieu à la formation d'aucun précipité.

DÉCOMPOSITION DES COMPLEXES MÉTALLIQUES PAR L'HYDROGÈNE SULFURÉ

Les complexes insolubles obtenus sont alors remis en suspension dans l'eau glacée, finement divisés à l'aide d'un agitateur et transvasés quantitativement dans des petits tubes de centrifugeur cylindro-coniques. On fait alors passer un courant lent d'H_2S qui libère les composés puriques et pyrimidiques et laisse les sulfures insolubles de plomb, de mercure ou d'argent. Les précipités de sulfure sont lavés 4 fois successives par l'eau distillée et les extraits recueillis par décantation dans un tube cylindrique de 25 cm de haut et de 2,5 cm de diamètre. Dans certains cas, l'état colloïdal des précipités de sulfure après 2 ou 3 lavages n'a pas permis une séparation satisfaisante par centrifugation ; cette séparation a été rendue possible en congelant les suspensions de sulfure dans l'eau, cette opération ayant pour effet de restituer au sulfure une structure non colloïdale.

Les tubes contenant les extraits étant plongés dans un bain de glace, on fait passer un courant d'air qui élimine l'excès d'H_2S ; chaque extrait est alors transvasé quantitativement dans un petit cristallisoir cylindro-conique, mis sous dessicateur en présence de P_2O_5 et concentré sous vide vers +2°C, l'opération nécessitant de 3 à 4 jours. Les extraits concentrés sont amenés à faible volume puis chromatographiés dans les conditions décrites plus loin.

Les bilans qui ont pu être ainsi établis, après dosage respectif de chacun des constituants puriques et pyrimidiques du mélange, ont été

rassemblés dans le tableau V ci-dessous où est exprimé en p. 100 le degré de précipitation de chaque composé dans les diverses conditions énoncées. Dans le cas des nucléotides libres apportés directement par la levure (adénosine phosphates et DPN), nous avons considéré comme égal à 100 le chiffre le plus élevé donné à l'analyse. En ce qui concerne les composés

TABLEAU V

Précipitation des nucléotides, nucléosides, bases puriques et pyrimidiques par les métaux lourds

(Composé précipité p. 100 du composé initial)

DÉRIVÉS DE	COMPOSÉS	MERCURE									ARGENT		PLOMB					
		Acétate ($CH_3.CO_2H$)			Acétate (NO_3H)			Nitrate			Nitrate		Acétate (NaOH)			Acétate (NH_3)		
		pH<7	pH>7	Total	pH<7	pH>7	Total	pH<7	pH>7	Total	NaOH	NH_3	pH<7	pH>7	Total	pH<7	pH>7	Total
Adénine	DPN	70	0	70	70	0	70	54	0	54	100	82	tr	49	50			
	ATP	tr	0	tr	95	0	95	95	0	95	100	61	0	15	15			
	ADP	36	0	36	82	0	82	42	0	42	100	93	48	22	70			
	AM_3P	53	6	59	85	4	89	61	24	85	100	98	65	25	90	50	24	74
	ac Adenyl.	97	2	99	93	0	93	96	0	96	100	99	90	3	93	89	4	93
	Adénosine	90	0	90	92	0	92	6	0	6	100	82	0	20	20	0	5	5
	Inosine	+	0	<100				+	0	<100	100	95	0	+	<100	0	+	<100
	Adénine	53	0	53	tr	0	tr	24	0	24	100	83	0	50	50	0	25	25
	Hypoxanthine	62	0	62	40	0	40	tr	0	tr	100	64	0	70	70	0	60	60
Guanine	ac Guanyl.	97	0	97	98	0	98	95	0	95	100	99	93	1	94	92	1	93
	Guanosine	+	0	<100				+	0	<100	100	87	0	+	<100	0	+	<100
	Xanthosine										100		0	7	7			
	Guanine										100		0	66	66			
	Xanthine	44	0	44	40	0	40	100	0	100	80	76	0	38	38	0	52	52
Cytosine	ac Cytidyl.	86	0	86	91	5	96	70	28	98	82	86	94	6	100	94	3	97
	Cytidine	+	0	<100				+	0	<100			0	100	100	0	90	90
	Cytosine	100	0	100							100		0	+	<100	0	+	<100
Uracile	ac Uridyl.	47	5	52	42	6	48	86	6	92	56	80	84	16	100	84	14	98
	Uridine	+	0	<100				+	0	<100	45		0	100	100	0	+	<100
	Uracile	100	0	100	58	0	58	90	0	90	100	1	0	5	5	0	tr	tr

ajoutés en quantité connue à l'extrait trichloracétique, on a considéré que la précipitation était totale lorsque la concentration déterminée à l'analyse ne différait pas de plus de 3 p. 100 de la concentration initiale.

Les résultats obtenus dans nos conditions expérimentales font apparaître plusieurs faits généraux importants :

— La précipitation des nucléotides puriques est quantitative par action directe du nitrate d'argent en milieu sodique faiblement alcalin. En milieu ammoniacal, la précipitation est encore satisfaisante, mais non quantitative dans certains cas. Les sels de mercure et de plomb conduisent à des bilans sensiblement plus faibles.

— La précipitation des nucléotides pyrimidiques est quantitative avec l'acétate de plomb à condition que l'opération à pH 6,5 soit complétée d'un traitement en milieu alcalin. Le rendement apparait légèrement plus faible lorsque l'alcalinité est apportée par l'ammoniaque. Les sels mercuriques, à l'exception du nitrate, sont moins efficaces, même si l'on tient compte de la fraction précipitée en milieu alcalin. L'argent ne permet pas davantage une précipitation totale des nucléotides pyrimidiques.

Les nucléosides et les bases puriques sont précipités en totalité par l'argent en milieu sodique, moins complètement en milieu ammoniacal. Seule la xanthine récupérée à 80 p. 100 échappe à cette règle. Les sels de mercure en milieu acide et ceux de plomb en milieu alcalin sont moins efficaces.

En ce qui concerne les nucléosides et les bases pyrimidiques le plomb à pH 8,5 se révèle excellent précipitant de l'uridine et de la cytidine mais par contre très mauvais agent de précipitation des bases correspondantes. Le nitrate d'argent en revanche, comme l'acétate mercurique, précipite en totalité la cytosine et l'uracile.

En résumé, lorsqu'on opère sur un extrait trichloracétique de levure :

— Le nitrate d'argent 1M à pH 8,5 en milieu sodique précipite quantitativement les nucléotides, nucléosides et bases puriques ainsi que la cytosine et l'uracile.

— L'acétate neutre de plomb 20 p. 100 agissant d'abord en milieu acide (pH 6,5) puis alcalin (pH 8,5) précipite quantitativement les nucléotides et nucléosides pyrimidiques.

c) **Technique expérimentale utilisée.**

C'est à partir de ces conclusions que nous avons établi une technique expérimentale permettant d'isoler quantitativement d'un extrait trichloracétique de levure autolysée ou non, un mélange complexe de composés puriques et pyrimidiques : 50 cm^3 d'extrait trichloracétique correspondant à 1 g de levure (poids sec) sont mesurés dans un tube de centrifugeur de 100 cm^3 et neutralisés au froid par la soude à pH 6,5. On ajoute progressivement une solution à 20 p. 100 d'acétate neutre de plomb jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de précipité ; celui-ci est rassemblé par centrifugation au froid (—10°C). Le pH du liquide surnageant est ensuite ajusté à 8,3-8,5 par la soude,cette alcalinisation s'accompagnant de la formation immédiate d'un précipité qui est réuni au précédent après nouvelle centrifugation au froid. Le surnageant est réajusté à pH 8,5 et additionné goutte à goutte d'une solution 1M de nitrate d'argent. On favorise la nouvelle précipitation en abandonnant le tube quelques heures au froid ; le précipité est réuni aux précédents par centrifugation et le liquide surnageant décanté.

Afin de s'assurer que la précipitation plomb-argent est bien complète on peut acidifier le surnageant à pH 6,5 par l'acide acétique et l'additionner de quelques gouttes soit d'acétate de plomb 20 p. 100, soit de nitrate mercurique ; aucun précipité ne doit se former. Dans le cas contraire, il doit être réuni aux précédents.

— Une variante de la technique précédente consiste à inverser l'ordre des réactifs. L'extrait trichloracétique alcalinisé par la soude à pH 8,5 est traité d'abord par le nitrate d'argent, puis après précipitation, par l'acétate de plomb au même pH. On revient ensuite à pH 6,5 pour vérifier si tout a été précipité. Cette façon d'opérer permet de gagner du temps et s'est révélée aussi efficace que l'autre.

Le complexe insoluble argento-plombique contenu dans un tube de centrifugeur de 100 cm^3 est mis en suspension dans une solution diluée au 1/40^e d'acétate de plomb 20 p. 100, transvasé quantitativement dans un tube cylindro-conique de 30 cm^3 et lavé 2 fois par le réactif dilué. Il est ensuite remis en suspension dans 5 cm^3 d'eau distillée, traité à l'hydrogène sulfuré et le précipité de sulfure lavé 4 fois consécutives. L'extrait obtenu est aéré puis concentré sous vide comme décrit précédemment, l'ensemble des opérations étant toujours effectué à basse température.

Le résidu est alors repris par l'eau ou par HCl 0,01N selon les cas et ajusté quantitativement à un faible volume. Dans le cas des levures non autolysées on transvase à l'aide d'un tube semi-capillaire dans des microtubes jaugés à 0,5 cm^3, ce qui correspond à une concentration 100 fois supérieure à celle des extraits trichloracétiques initiaux. Dans certaines expériences la concentration était de l'ordre de 50.

Ce sont ces extraits qui sont ensuite chromatographiés.

CONCENTRATION DIRECTE DES EXTRAITS TRICHLORACÉTIQUES

Dans certains cas, la concentration des extraits trichloracétiques en composés puriques et pyrimidiques s'est révélée telle qu'il n'a pas été nécessaire d'isoler ces composésé par l'intermédiaire de leurs sels de métaux lourds. En conséquence, les analyses chromatographiques ont été effectuées directement sur les extraits trichloracétiques préalablement concentrés dans le rapport de 10/1 par évaporation sous vide à basse température en présence de P_2O_5. Bien entendu, ce mode opératoire n'a pu être mis à profit que dans les cas où la nature des constituants acido-solubles était telle qu'aucune transformation hydrolytique n'était à redouter. La technique s'est révélée particulièrement utile dans le cas des levures fortement autolysées, les extraits acido-solubles étant alors uniquement constitués de bases puriques et pyrimidiques.

B. — Constituants acido-insolubles.

a) Extraction des constituants lipidiques.

Après extraction trichloracétique et lavage à l'eau, le résidu cellulaire provenant de 2 g de levure (poids sec) est traité directement dans le tube de centrifugeur par 2 fois 20 cm^3 d'éthanol glacé, puis pendant 1 heure par 15 cm^3 d'éthanol à l'ébullition. La délipidation est achevée par un nouveau traitement à chaud au mélange éthanol-éther (3^v-1^v) comportant 3 extractions successives de 10 cm^3 pendant 15 minutes. Après centrifugation, l'excès d'alcool est éliminé par évaporation au bain-marie bouillant en agitant constamment jusqu'à l'obtention d'un produit blanc-gris pulvérulent. On détermine enfin le poids sec du résidu cellulaire délipidé par dessiccation à 102°C jusqu'à poids constant, le tube de centrifugeur ayant été préalablement taré.

Ce mode opératoire consistant à effectuer l'ensemble des opérations dans un même tube réduit notablement les erreurs par défaut. Dans tous les cas, les essais ont été effectués en double parfois en quadruple ; les différences de poids sec observées représentaient une erreur ne dépassant pas $\pm$ 0,6 p. 100 et le plus souvent inférieure à $\pm$ 0,2 p. 100.

Selon les échantillons examinés, 1 g de levure initiale non autolysée (poids sec) fournit après extraction des fractions acido-soluble et lipidique, entre 693 et 870 mg (poids sec) de constituants « insolubles » comprenant la totalité du matériel protéique des cellules y compris les acides nucléiques. L'importance quantitative de cette fraction décroît bien entendu à mesure que progresse la dégradation enzymatique et le résidu cellulaire en fin d'autolyse, de nature presque essentiellement glucidique, constitue environ 11 à 13 p. 100 du poids initial de la levure.

Le résidu cellulaire obtenu est finement divisé au mortier puis homogénéisé par tamisage. Après nouvelle dessiccation à l'étuve, des parties aliquotes sont prélevées en vue des opérations suivantes : hydrolyse chlorhydrique en tube scellé pour déterminer la composition nucléotidique de l'ARN., fractionnement acide ou alcalin conduisant à la détermination quantitative des 2 acides nucléiques, dosage du phosphore total. Dans les cas où l'importance quantitative du résidu cellulaire était trop faible (levures en fin d'autolyse) les déterminations précédentes ont été effectuées séparément sur les fractions résiduelles obtenues à partir de plusieurs essais identiques.

b) Fractionnement des constituants nucléiques.

Deux techniques de fractionnement permettant la détermination des 2 types d'acides nucléiques ont été pratiquées sur la fraction « insoluble » ainsi obtenue.

— L'une établie par SCHNEIDER (231) réalisant l'extraction des 2 acides nucléiques à chaud et en milieu acide.

— L'autre, préconisée par SCHMIDT et THANNHAUSER (228) procède, après hydrolyse alcaline, à un fractionnement permettant de déterminer séparément l'ARN et l'ADN.

MÉTHODE DE SCHNEIDER

Outre l'acide trichloracétique 5 p. 100 préconisé par l'auteur, nous avons utilisé comme agent d'extraction l'acide perchlorique 5 p. 100 lequel possède les mêmes propriétés de précipitation vis-à-vis des protéines sans présenter d'absorption notable à 260 m μ.

Dans un tube de centrifugeur cylindro-conique, on pèse un poids d'« insoluble » tel qu'il corresponde à 0,5 g de levure initiale (poids sec).

Le produit est alors extrait 4 fois pendant 15 minutes à 90°C par l'acide trichloracétique 5 p. 100 ou 3 fois à 70°C pendant 20 minutes par l'acide perchlorique 5 p. 100, les extraits étant recueillis par décantation après centrifugation.

— Sur le liquide d'extraction on détermine le P total et l'acide nucléique total par spectrophotométrie.

— Sur l'insoluble résiduel on dose le P total.

MÉTHODE DE SCHMIDT-THANNHAUSER

Hydrolyse alcaline de la fraction « nucléique ».

Contrairement à ce qui est observé avec les tissus animaux, l'hydrolyse alcaline de la fraction nucléique des levures laisse un résidu insoluble important, contenant une certaine quantité de phosphore, vraisemblablement formé des constituants cellulaires de nature polysaccharide alcali-résistants, ayant pour origine les membranes des cellules. L'importance quantitative de ce résidu et sa teneur en phosphore varient en fonction des conditions d'hydrolyse (concentration en base et température) ainsi qu'en témoignent les résultats suivants obtenus après 18 heures d'hydrolyse.

	NaOH 0,3 N 37° C	NaOH 1 N 16° C	NaOH 1 N 28° C	NaOH 1 N 37°C
P résiduel p 100 du P « nucléique ».....	3,6	1,8	0,8	0,3

La solubilisation progressive du résidu polysaccharide détermine un trouble des hydrolysats de plus en plus marqué ; d'autre part, nous avons vérifié qu'avec la soude 0,3 N l'hydrolyse de l'ARN était incomplète. En conséquence, nous avons dans tous nos essais, utilisé la soude 1N pendant 18 heures à température ordinaire, dans les conditions suivantes :

— Dans un tube de centrifugeur de 30 cm³, on pèse un poids d'« insoluble » correspondant à 1 g de levure initiale (poids sec) ; après addition

de 15 cm³ de NaOH 1N on abandonne 18 heures à température ordinaire en agitant fréquemment. L'hydrolysat est ensuite séparé de l'insoluble résiduel par centrifugation, et ce dernier épuisé 4 fois successives par la soude 1N, les lavages étant réunis à l'hydrolysat par décantation et le volume final amené à 25 cm³. On détermine le phosphore total sur une partie aliquote.

Fractionnement de l'hydrolysat alcalin.

Dans un tube de centrifugeur cylindro-conique de 30 cm³, on mesure 10 cm³ de l'hydrolysat alcalin que l'on refroidit ensuite vers 2-3°C. On précipite alors les protéines et l'ADN par acidification dans les conditions décrites par les auteurs : d'abord par HCl 6N (2 cm³) puis par l'acide trichloracétique 5 p. 100 (10 cm³) les réactifs étant eux-mêmes glacés. Après homogénéisation, on abandonne une nuit en glacière. Nous avons en effet constaté qu'une séparation satisfaisante ne pouvait être obtenue qu'en opérant à basse température. Le précipité ADN-protéines est alors séparé par centrifugation au froid, et l'extrait acido-soluble contenant les mononucléotides de l'ARN est séparé par décantation ; après lavage du précipité par 3 fois 1 cm³ d'acide trichloracétique froid, l'extrait acido-soluble est amené à 25 cm³.

Sur cet extrait, on détermine le P total, le ribose et, après dilutions convenables, la densité optique à 260 mμ.

Le précipité ADN-protéines est lui-même traité à chaud pour en isoler l'ADN soit par l'acide trichloracétique 5 p. 100 à 90°C, soit par l'acide perchlorique 5 p. 100 à 70°C dans les conditions énoncées précédemment, l'extrait acide étant amené à 10 cm³. Sur une partie aliquote on détermine le désoxyribose, sur une autre la densité optique à 265 mμ. Le phosphore de l'ADN est déterminé d'autre part sur le précipité obtenu après acidification de 5 cm³ d'hydrolysat alcalin dans les mêmes conditions que précédemment.

c) **Isolement de la « zymocaséine » (phosphoprotéine).**

La phosphoprotéine dont la présence chez les levures a été signalée par Thomas (252) et dénommée « zymocaséine » a été extraite à partir de deux levures commerciales de boulangerie et de brasserie dans les conditions décrites par l'auteur.

— La levure préalablement séchée et finement divisée est extraite pendant 8 heures à 35°C par 10 parties d'une solution à 0,5 p. 100 de CO_3Na_2. Après centrifugation, le liquide d'extraction est acidifié à 0°C par l'acide acétique. Le précipité est séparé, lavé à l'eau acide, puis redissous dans CO_3Na_2 0,5 p. 100. On effectue une 2e précipitation à froid en milieu acétique ; la protéine est ensuite lavée puis séchée.

IV. — ISOLEMENT ET PURIFICATION DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE

Extraction de l'ARN brut.

Deux méthodes faisant appel à des conditions et des agents d'extraction différents, ont été utilisées pour isoler l'ARN d'une levure de boulangerie fraîchement récoltée. La première réalise l'extraction de l'acide nucléique par la soude diluée à basse température, selon la technique de CHANTRENNE (48). La seconde, fait intervenir un traitement à chaud par les solutions salines dans des conditions voisines de celles décrites par DAVIDSON et SMELLIE (64).

a) Extraction par la soude.

— 500 g de levure fraîche sont mis en suspension dans 3 litres d'une solution glacée de soude environ 1N ; on laisse en contact 1 h 1/2 au froid. On amène ensuite la suspension à pH 6,5 par addition d'acide acétique et on élimine la levure par centrifugation. Le liquide jaune clair surnageant est acidifié vers pH 2,5-3 par HCl. On précipite l'ARN brut par addition d'éthanol (0,8 volume) et le sépare par centrifugation. Le précipité est lavé à l'alcool, puis à l'éther et enfin séché.

b) Extraction par le chlorure de sodium.

— La levure est extraite pendant 6 heures à 85°C par ClNa 10 p. 100 à raison de 20 cm^3 par gramme de matière sèche. Après refroidissement la suspension est centrifugée et le surnageant additionné de 3 volumes d'éthanol qui précipite le nucléate de sodium. On laisse s'achever la précipitation pendant 12 heures au froid. Le nucléate est ensuite séparé par centrifugation, lavé à l'alcool puis à l'éther et séché.

Purification.

Les préparations brutes ainsi obtenues, qui donnent une réaction du biuret positive, sont déprotéinisées par formation du gel protéines-chloroforme selon la méthode de SEVAG et coll. (233), en leur appliquant le mode opératoire décrit par SMITH et MARKHAM (235), le traitement étant répété 4 fois consécutives. Par ailleurs, un échantillon commercial d'ARN de levure a été déprotéinisé dans les mêmes conditions.

Les 2 préparations extraites de la levure donnent encore, après traitement au chloroforme, une réaction du biuret très faible. L'échantillon commercial ne donne plus la réaction après un traitement identique.

Sur les préparations brutes et purifiées on a déterminé les teneurs en azote total et phosphore total.

V. — MÉTHODES D'HYDROLYSE

Dans tous les cas où nous avons eu à déterminer la composition nucléotidique des levures expérimentées, soit avant soit pendant l'autolyse, nous avons utilisé la méthode d'hydrolyse de SMITH et MARKHAM (235). La méthode originale, qui préconise l'acide chlorhydrique 1N pour hydrolyser quantitativement en 1H à 100°C l'ARN en ses 2 bases puriques et ses 2 nucléotides pyrimidiques, a été établie dans le cas de préparations d'ARN isolées et purifiées. Dans notre travail, aucun isolement n'a été pratiqué et l'hydrolyse a été effectuée directement soit sur la levure totale, soit sur la fraction nucléique après extraction des constituants acido-solubles et lipidiques. La même méthode a été appliquée dans un cas particulier à des préparations d'ARN isolées.

Cette méthode d'hydrolyse directe de la fraction nucléique sans isolement préalable n'entraîne pas, selon THOMAS (253) de dégradation appréciable des protéines (1).

Nous avons vérifié par l'analyse qu'une réduction à 20 minutes de la durée d'hydrolyse ne libérait pas quantitativement les nucléotides pyrimidiques et qu'en portant cette durée à 2 heures les valeurs en adénine et guanine accusaient une légère diminution résultant probablement d'un début de désamination. L'influence du temps d'hydrolyse sur la libération quantitative des constituants de l'ARN se reflète d'autre part dans l'importance de la fraction phosphorée résiduelle après traitement chlorhydrique. Des parties aliquotes d'une même fraction nucléique de levure ont été hydrolysées par HCl 1N à 100°C pendant 20, 60 et 120 minutes ; on a trouvé que le P résiduel représentait respectivement 6,8-2,3 et 0,8 p. 100 du P nucléique. En conséquence le temps d'hydrolyse de 1 heure a été retenu dans tous nos essais.

Dans tous les cas en effet, qu'il s'agisse des cellules entières ou de leur fraction nucléique, l'hydrolyse a laissé une fraction phosphorée résiduelle, représentant entre 0,6 et 1,6 p. 100 du P total de la levure.

Nous avons vérifié, d'autre part, que l'hydrolyse HCl 1N pendant 1 heure à 100°C ne libère pas quantitativement les nucléotides pyrimidiques lorsqu'on opère en tube non scellé.

Compte tenu de ces diverses remarques, nous avons adopté le mode opératoire suivant :

— Dans un tube à hydrolyse de 30 cm^3 (l = 13 cm, d = 2 cm) contenant quelques billes de verre et muni à sa partie supérieure d'une allonge (l = 15 cm, d = 0,8 cm) permettant le scellement ultérieur, on

(1) Afin d'éliminer les protéines à coup sûr, nous avons envisagé d'effectuer l'hydrolyse chlorhydrique de l'ARN en opérant sur un extrait trichloracétique ou perchlorique des levures entières ou de leur fraction nucléique obtenue d'après la méthode proposée par SCHNEIDER (231). Mais ce mode opératoire a dû être abandonné, l'extraction dans ces conditions n'étant pas quantitative.

introduit, à l'aide d'un entonnoir à longue tige, 500 mgr. (poids sec) de levure ou son équivalent en fraction nucléique. On facilite l'introduction dans le tube de la poudre à analyser par un agitateur de verre très fin. Les particules restantes sont alors entraînées quantitativement en laissant s'écouler en plusieurs fractions à la pipette 10 cm^3 d'HCl 1N. On facilite le mouillage du produit par addition d'une goutte d'alcool amylique. Le tube est alors scellé à sa partie supérieure et, après avoir homogénéisé le mélange par agitation à l'aide des billes de verre, porté au bain-marie bouillant pendant 1 heure en agitant de telle sorte que la levure ne sédimente pas.

Après refroidissement le tube est ouvert et son contenu transvasé quantitativement dans un tube de centrifugeur cylindro-conique. La centrifugation sépare l'insoluble protéique de l'hydrolysat, celui-ci étant transvasé dans une petite capsule de verre. Le résidu insoluble est remis en suspension dans HCl 1N, recentrifugé et lavé ainsi 4 fois consécutives, les lavages étant réunis à l'hydrolysat. La concentration est alors effectuée en dessiccateur sous vide à température ordinaire en présence de P_2O_5 et, selon le nombre d'essais à concentrer, en présence de quelques pastilles de soude destinées à fixer l'excès d'HCl libéré après élimination de l'eau. Il faut prendre soin d'arrêter la concentration lorsqu'il reste un volume de l'ordre de 0,5 à 1 cm^3. Sans pouvoir en donner la raison, nous avons en effet constaté que, lorsque l'hydrolysat était concentré à sec puis remis en solution, les résultats obtenus ultérieurement en chromatographie accusaient de façon constante un léger déficit en nucléotides pyrimidiques. Par HCl 1N on amène ensuite l'hydrolysat à 2 cm^3 dans un petit tube jaugé, en transvasant quantitativement à l'aide d'un tube effilé semi-capillaire. Après homogénéisation l'hydrolysat est soumis à la chromatographie sur papier.

Toutes les hydrolyses de levure totale ont été effectuées sur des échantillons préalablement cryodesséchés. Un tel traitement permet en effet, d'obtenir un matériel très homogène et surtout très finement divisé rendant ainsi optima les conditions d'hydrolyse. Ceci est apparu indispensable pour obtenir des résultats reproductibles. Nous avons en effet constaté des variations sensibles en opérant sur des levures séchées à température ordinaire. La granulation hétérogène de telles préparations, même après broyage intense au Turmix et tamisage, modifie sans doute la pénétration des agents d'hydrolyse.

Hydrolyse des préparations isolées d'ARN.

Dans les quelques cas où nous avons été amenés à établir la composition nucléotidique des préparations isolées d'ARN, les conditions ont été les suivantes :

— Après détermination de la substance sèche, on pèse 50 mg d'ARN (poids sec) dans un petit tube cylindro-conique ; on ajoute environ 0,5 cm^3 d'HCl 1N et porte quelques instants au bain-marie pour faciliter la mise en suspension. A l'aide d'un tube semi-capillaire on transvase quantitativement dans un petit tube à hydrolyse (d = 0,8 cm) préalablement jaugé approximativement à 2 cm^3 ; on complète à 2 cm^3 par HCl 1N et ajoute 2 billes de verre avant de sceller. On hydrolyse comme précédemment 1 heure au bain-marie ; après ouverture du tube on transvase quantitativement dans un autre tube jaugé exactement à 2,5 cm^3.

VI. — MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES

C'est le principe de la chromatographie de partage sur papier qui a été appliqué tout au long de notre travail pour séparer individuellement les composés puriques et pyrimidiques contenus soit dans les extraits acido-solubles des levures autolysées ou non, soit dans les hydrolysats chlorhydriques des levures ou de leurs fractions nucléiques. Après séparation dans des systèmes de solvants appropriés et localisation sur les chromatogrammes, les produits ont été élués et dosés individuellement par spectrophotométrie dans l'ultra-violet.

A. — Séparation des composés puriques et pyrimidiques.

a) Hydrolysats chlorhydriques.

Les hydrolysats ayant pour origine soit les levures totales non autolysées, soit leur fraction nucléique à divers stades de l'autolyse, soit encore dans certains cas les préparations d'ARN isolées de la levure, ont été traités en chromatographie unidimensionnelle dans les conditions décrites par Smith et Markham (235) à l'aide du solvant Butanol tertiaire acidifié par HCl à une concentration 0,8 N. Le plus souvent la chromatographie a été pratiquée en ascendant à température ordinaire dans des cuves cylindriques de verre (h = 30 cm, d = 14 cm) fermées à leur partie supérieure par des couvercles de verre maintenus à l'aide de griffes métalliques, un joint de caoutchouc ou mieux de polyéthylène assurant l'étanchéité. Le papier utilisé (Whatmann n°1) est découpé en feuilles de 38 × 28,5, la ligne de départ étant tracée à 4 cm du bord inférieur de façon à réaliser un écoulement total de 24 cm.

Les hydrolysats à analyser sont déposés à l'aide d'une micropipette par taches de 10 µl distantes de 3 en 3 cm, puis séchées à l'air libre de préférence au-dessus d'un courant d'air chaud (étuve ou radiateur). On prend soin de réserver à chaque extrémité de la feuille une bande de 5,5 cm sur laquelle seront prélevés ultérieurement les blancs papier, ce qui permet

de disposer sur la même ligne de départ 9 hydrolysats différents. Après séchage, on réunit, en les cousant, les 2 extrémités de la feuille en évitant de les faire se chevaucher, de façon à obtenir un cylindre d'une hauteur de 28,5 cm. Le cylindre de papier est alors déposé dans la cuve contenant 35 à 40 cm³ de solvant. Il faut de 60 à 72 heures pour que le front du solvant atteigne le sommet du cylindre ; le chromatogramme est alors séché dans un courrant d'air chaud puis photographié en lumière ultra-violette.

Les Rf respectifs des produits ainsi séparés sont très voisins de ceux obtenus par SMITH et MARKHAM (235) en chromatographie descendante.

	guanine	adénine	acide cytidylique	ac. uridylique
	—	—	—	—
Smith-Markham.....	0,20	0,32	0,46	0,77
en ascendant.....	0,21	0,33	0,48	0,82

b) **Extraits contenant les constituants acido-solubles.**

Les extraits concentrés au froid sous vide et contenant les constituants puriques et pyrimidiques acido-solubles séparés de leur milieu trichloracétique par précipitation plombique et argentique sont soumis en chromatographie bi-dimensionnelle à 2 systèmes distincts de solvants : l'un permettant la séparation individuelle des nucléotides, l'autre celle des nucléosides et des bases.

Séparation bi-dimensionnelle des Nucléotides.

Ce n'est qu'après de nombreux essais que nous sommes parvenus à retenir 2 solvants alcooliques, l'un acide, l'autre alcalin, permettant une séparation satisfaisante des constituants acido-solubles de nature nucléotidique.

En première dimension nous avons conservé le système Butanol tertiaire-chlorhydrique de SMITH et MARKHAM (235). Parmi la plupart des solvants qui ont été proposés pour séparer les nucléotides et dont nous avons expérimenté environ une vingtaine, c'est le seul qui présente l'avantage de séparer de façon satisfaisante les nucléotides pyrimidiques à Rf élevés des nucléotides puriques de Rf plus faibles. Par contre, la séparation de ces derniers demeure insuffisante par suite de leurs valeurs de Rf très voisines. Nous sommes parvenus à améliorer cette séparation des nucléotides puriques sans modifier celle des nucléotides pyrimidiques en abaissant l'acidité du solvant de 0,8 à 0,3 N, ce qui est réalisé pratiquement en mélangeant 70 cm³ de Butanol 3° et 30 cm³ d'HCl 1N. Dans ces conditions, on obtient une meilleure répartition des mono, di et triphosphates d'adénosine, le Rf étant d'autant plus faible que la molécule est davantage phosphorylée, l'isomère en 5' ayant en outre un Rf plus faible que l'isomère en 3'.

Voici les valeurs de Rf obtenues avec des marqueurs dans ces conditions, comparativement à celles des mêmes constituants séparés par le même solvant mais d'acidité plus élevée.

TABLEAU VI

Séparation des Nucléotides
dans le système Butanol-tertiaire-chlorhydrique en fonction de l'acidité.

	0,8 N (en HCl)	0,3 N (en HCl)
TPN	0,03	0
DPN	0,06	0,02
ITP	0,25	0,06
ATP	0,28	0,08
IDP	0,30	0,18
ADP	0,32	0,20
IMP	0,32	0,32
AMP	0,37	0,34
G	0,34	0,35
A	0,38	0,38
C	0,46	0,45
U	0,80	0,80
PO_4	0,94	0,94

A cette concentration en HCl, le solvant hydrolyse partiellement ITP et ATP mais n'affecte pas les nucléosides diphosphates correspondants. On notera en outre dans les 2 cas que les nucléotides désaminés présentent, pour un même degré de phosphorylation, une valeur de Rf légèrement plus faible que les nucléotides correspondants non désaminés. Enfin ce solvant présente l'avantage de séparer totalement les nucléotides de l'acide phosphorique à Rf très élevé. Utilisé en première dimension il permet d'éliminer ainsi quasi totalement l'orthophosphate précipité avec les nucléotides acido-solubles par les sels d'argent et de plomb. Notons au passage que le solvant à concentration élevée en HCl permet de séparer de façon satisfaisante le DPN et le TPN des autres nucléotides.

Pour la seconde dimension nous avons fait appel au système *n*-Propanol (60*v*)-NH_3 conc (30 *v*)-eau (10 *v*) classé par HANES et ISHERWOOD (102) dans le groupe D des solvants alcooliques basiques miscibles à l'eau. Un tel système effectue à la fois la séparation des nucléotides, des nucléosides et des bases, la présence d'acide phosphorique dans la molécule réduisant considérablement la migration du composé. C'est ainsi qu'après un écoulement de 24 heures à 25°C l'adénosine a un Rf de 0,68, alors que celui de l'acide adénylique n'est que de 0,19 seulement.

Cette propriété du solvant de séparer les nucléotides de Rf faibles des nucléosides et des bases de Rf plus élevés a été mise à profit en portant la durée d'écoulement de 24 heures à 72 ou 96 heures. Dans ces conditions les nucléosides et les bases sont éliminés du chromatogramme cependant que les nucléotides voient leur migration sur le papier augmentée et leur séparation améliorée. Les valeurs de Rf rapportées ci-dessous rendent compte de la séparation des nucléotides et des autres composés

puriques et pyrimidiques en fonction de la durée d'écoulement. Dans le cas des écoulements de longue durée, la position respective des nucléotides a été rapportée à celle de l'acide adénylique prise comme unité (R ac. adénylique).

TABLEAU VII

Séparation des Nucléotides dans le système *n*-Propanol-NH_3-eau, en fonction de la durée d'écoulement.

	24 H. à 20°C Rf		4 jours à 20°C R ac, adénylique
G	0,09	TPN	0,16
U	0,13	ITP	0,22
C	0,15	IDP	0,33
A	0,19	IM_5P	0,47
xanthine	0,27	G	0,48
guanosine	0,33	ATP	0,50
guanine	0,34	ADP	0,69
xanthosine	0,41	U	0,70
uridine	0,44	DPN	0,77
hypoxanthine	0,46	AM_5P	0,82
cytidine	0,52	C	0,85
inosine	0,52	A	1
uracile	0,55	$PO_4\equiv$	0,55
cytosine	0,58		
adénine	0,63		
adénosine	0,68		

On observe, de même qu'avec le système Butanol 3°-HCl, un déplacement plus faible pour les nucléotides d'adénine désaminés que pour les nucléotides correspondants non désaminés ; également un déplacement d'autant plus grand que la molécule est moins phosphorylée, l'acide adénylique de l'ARN ayant une vitesse de migration plus grande que son isomère en 5'. La nature fortement alcaline du solvant détermine par ailleurs une hydrolyse partielle de l'ATP et de l'ITP en leurs di et monophosphates correspondants.

L'emploi du système propanol ammoniacal en 2e dimension avec écoulement prolongé permet d'éliminer les nucléosides et les bases séparés en même temps que les nucléotides en 1re dimension dans le système butanol 3°-HCl.

Voici les conditions expérimentales qui ont été pratiquées dans la séparation bi-dimensionnelle des nucléotides :

Conditions expérimentales.

Sur une feuille de papier Whatmann n°1 de 38 × 28,5 cm on dépose à 12 cm du bord gauche et à 4 cm du bord inférieur, à l'aide d'une micropipette et par fractions de 10 µl, 10, 20 ou 30 µl de l'extrait argentique plombique à analyser. La feuille est ensuite roulée en cylindre, cousue et

soumise en chromatographie ascendante dans le système Butanol 3°-HCl (0,3 N) dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour les hydrolysats chlorhydriques. Le bord supérieur de la feuille est atteint par le solvant entre 48 et 60 heures à température ordinaire. Après avoir été déroulé et séché, le chromatogramme est examiné en lumière ultra-violette et on trace au crayon le contour des produits séparés en notant la position des composés de Rf maxima.

On découpe alors à la partie supérieure de la feuille et sur la plus grande dimension une bande (de 2 à 4 cm de large selon les cas) permettant d'éliminer une partie des phosphates accumulés. Par ailleurs, le bord droit du chromatogramme parallèle au sens de l'écoulement en 1re dimension est découpé en pointes destinées à faciliter la régularité de l'écoulement en 2e dimension. Le chromatogramme ainsi préparé (25 × 37 cm) est alors disposé par sa partie supérieure (bande de 10 à 11 cm) dans une gouttière de verre de 200 cm^3 (l = 60 cm. d = 3 cm) elle-même placée dans une chambre en verre étanche de 64 × 64 × 36 cm. Les dimensions de l'enceinte étanche permettent d'y placer 2 gouttières ; on peut donc disposer 4 chromatogrammes par gouttière et effectuer ainsi 8 écoulements simultanés.

On verse dans chaque gouttière 120 cm^3 de solvant ce qui correspond à 30 cm^3 par chromatogramme. A l'usage, nous avons en effet jugé préférable d'effectuer la chromatographie en 2e dimension en utilisant un volume de solvant tel qu'une fois épuisé, la séparation des produits soit optima. Dans les premiers essais, on versait dans les gouttières le solvant en excès et les chromatogrammes étaient retirés après un temps fixe ; mais un tel procédé ne permettait pas d'obtenir de résultats reproductibles, les conditions de température modifiant plus ou moins la vitesse d'écoulemant bien que l'on ait pris soin de disposer les chambres dans une enceinte isotherme.

A raison de 30 cm^3 de Propanol-ammoniacal par feuille de 28 × 35 cm offrant une longueur utile d'écoulement de 26 cm, l'acide adénylique parcourt entre 3 et 4 jours une distance moyenne d'environ 17 à 19 cm sans que les conditions de température interviennent de façon notable. Le chromatogramme est alors séché dans un courant d'air chaud dépourvu de vapeurs chlorhydriques puis photographié en lumière ultra-violette.

Séparation bi-dimensionnelle des nucléosides et des bases.

Elle a pu être effectuée dans de bonnes conditions en conjuguant 2 types de solvants alcooliques, l'un monophasique utilisé pour la 1re dimension, l'autre biphasique utilisé en 2e dimension.

— Le premier solvant, *n*-butanol (86 *v*) eau (14 *v*) + NH_3 a été décrit par Markham et Smith (177) comme séparant les nucléosides et

les bases mais non les nucléotides. Les valeurs de Rf indiquées par les auteurs, dont la plus élevée, celle de l'adénine, est de 0,28, montrent qu'un mélange complexe de nucléosides et de bases ne peut être séparé de façon satisfaisante qu'en prolongeant le temps d'écoulement et en laissant le solvant s'écouler hors de la feuille, ce qui interdit la chromatographie ascendante. Nous avons constaté qu'une durée d'écoulement de 3 jours à température ordinaire entraînait l'adénine à environ 24 cm de la ligne de départ et permettait ainsi une séparation meilleure, bien qu'incomplète des autres constituants et c'est cette durée qui a été utilisée dans toutes nos expériences.

Nous indiquons ci-dessous les valeurs de Rf publiées par MARKHAM et SMITH (177) parallèlement aux déplacements respectifs par rapport à l'adénine prise comme unité (R adénine) des bases et nucléosides tels qu'ils ont été déterminés dans nos conditions expérimentales à l'aide de corps purs.

TABLEAU VIII

Séparation des nucléosides et des bases en chromatographie unidimensionnelle dans le système *n*-butanol (86 *v*), eau (14 *v*), NH_3.

	R_f (selon Markham-Smith)	Radénine (écoulement 3 jours à 18-20° C.)
acide urique	0	0
xanthosine	—	0,02
xanthine	0,05	0,05
inosine	—	0,14
guanosine	0,03	0,18
cytidine	0,11	0,24
guanine	0,11	0,32
uridine	0,08	0,37
hypoxanthine	0,12	0,40
adénosine	0,22	0,57
cytosine	0,24	0,57
uracile	0,19	0,74
adénine	0,28	1

La photographie b_1, Planche B, illustre l'aspect d'un chromatogramme obtenu avec ce solvant à partir d'un hydrolysat formique d'ARN.

On remarque que nous ne retrouvons pas l'ordre de migration indiqué par les auteurs anglais et que certains constituants tels que l'uridine et l'uracile présentent une vitesse de migration plus grande que celle indiquée. Nous pensons que ces différences peuvent avoir pour origine la concentration en ammoniaque de l'enceinte où s'effectue la chromatographie, bien que nous ayions respecté les conditions précisées par les auteurs,en additionnant le solvant placé au fond de la cuve de 5 p. 100 (en volume) d'ammoniaque concentré (D = 0,88). Il est vraisemblable que la capacité totale de la cuve intervient. Nous avons cependant constaté qu'en utilisant du *n*-butanol saturé d'eau, soit un solvant légèrement

plus aqueux que celui indiqué, la séparation de l'uracile et de l'adénine était moins bonne et que les déplacements respectifs de l'adénosine et de l'hypoxanthine étaient intervertis. Nous avons vérifié en outre qu'un écoulement prolongé n'entraînait pas les nucléotides.

— Des nombreux solvants expérimentés en vue d'obtenir une séparation satisfaisante des bases et des nucléosides en 2e dimension, c'est le système biphasique tampon phosphate-alcool isoamylique décrit par CARTER (41) qui a été retenu, bien que ce solvant ait été l'objet de certaines réserves (4).

Pour notre part, nous avons dans tous les cas obtenu des résultats reproductibles et satisfaisants en prenant soin de respecter les conditions expérimentales décrites par CARTER, bien que nous ayions pratiqué la chromatographie descendante. Voici les valeurs de Rf que nous avons obtenues, comparées à celles publiées par CARTER après chromatographie ascendante.

TABLEAU IX

Séparation des nucléosides et des bases en chromatographie unidimensionnelle dans le système biphasique PO_4HNa_2 5 p. 100-alcool isoamylique.

	Valeurs de R_f	
	valeurs expérimentales	selon Carter
	—	—
acide urique	0,38	—
adénine	0,38	0,44
guanine	0,40	0,02
xanthine	0,47	0,49
adénosine	0,53	0,54
hypoxanthine	0,57	0,57
guanosine	0,62	0,62
xanthosine	0,68	—
inosine	0,74	—
cytosine	0,75	0,73
uracile	0,75	0,73
cytidine	0,80	0,76
uridine	0,83	0,79

Il y a bon accord entre les valeurs rapportées de part et d'autre à l'exception de la guanine. Le même solvant effectue également la séparation des nucléotides mais, en prenant soin de ne l'utiliser qu'en 2e dimension, les nucléotides de Rf nul dans le système butanol-eau-HN_3, sont déplacés suivant une perpendiculaire à la 1re dimension et n'interfèrent pas avec les nucléosides et les bases à l'exception dans certains cas de la xanthosine. Il est évident qu'il n'en serait pas de même si l'ordre d'utilisation des solvants était inversé.

Conditions expérimentales :

Compte tenu des observations précédentes, voici les conditions expérimentales qui ont été adoptées pour la séparation chromatogra-

phique bidimensionnelle des nucléosides et des bases à l'aide des solvants décrits.

— Sur une feuille de papier Whatmann n°1 de 57 × 47 cm on trace dans le sens de la longueur une ligne située à 12 cm du bord sur laquelle on dépose, à 8 cm de chaque extrémité, l'extrait à analyser par fractions de 10 µl ; par ailleurs, le bord de la feuille parallèle à cette ligne de départ est découpé en pointes. Chaque feuille, qui permet ainsi de mener simultanément 2 essais, est déposée dans une gouttière de verre de 200 cm^3 (I = 60 cm, d = 3 cm) elle-même située dans une enceinte étanche de 64 × 32 × 62 cm. On dépose au fond de la cuve un vase plat contenant 50 cm^3 du mélange *n*-butanol-eau additionné de 2,5 cm^3 d'NH_3 concentré et on verse dans la gouttière le même solvant non ammoniacal à raison de 45 cm^3 par feuille. La cuve étanche construite pour contenir 2 gouttières permet ainsi de traiter à la fois en une même opération 8 extraits, chaque gouttière contenant alors 90 cm^3 de solvant.

On laisse l'écoulement s'effectuer pendant 3 jours à température ordinaire, sans précautions particulières ; la totalité du solvant s'est alors écoulée et l'adénine est distante d'environ 24 cm de la ligne de départ. Après séchage à l'air libre ou mieux dans un courant d'air chaud, chaque feuille de 57 × 37 cm est découpée en 2 parties égales (28,5 × 37 cm) examinée en lumière ultra-violette et le contour des produits séparés marqué au crayon. Pour des raisons d'ordre purement pratique la 2e dimension a toujours été effectuée en descendant sur la partie du chromatogramme s'arrêtant à la limite de la cytosine et de l'uracile, ce qui permettait d'opérer, avec le matériel dont nous disposions, sur des chromatogrammes de petites dimensions (28 × 17 cm) offrant un écoulement utile de 20 cm. L'uracile et l'adénine sont en effet bien séparés dans le butanol-NH_3 et leur traitement ultérieur en 2e dimension demeure superflu.

Les chromatogrammes destinés à être traités par le solvant de Carter sont disposés dans une petite gouttière de verre de 35 cm^3 (l = 19, d = 2,5 cm) de façon à être en contact avec les 2 phases ; on verse alors 16 cm^3 de la phase aqueuse puis 8 cm^3 de la phase alcoolique. L'écoulement, effectué à température ordinaire dans des cuves cylindriques étanches (h = 60 cm, d = 20 cm), est très rapide et l'extrémité inférieure du chromatogramme est atteinte après 2 heures 30 environ. Les feuilles sont alors séchées à l'air libre puis photographiées en lumière ultra-violette.

Remarque.

La séparation en 2e dimension dans le solvant de Carter peut être effectuée également dans de bonnes conditions en chromatographie ascendante. Chaque chromatogramme de 28,5 × 37 cm est alors roulé

et cousu de façon à former un cylindre de 28, 5 cm de haut et traité dans une cuve cylindrique étanche (h = 30 cm ; d = 14 cm) par 24 cm³ de la phase aqueuse et 12 cm³ de la phase alcoolique. La durée d'écoulement est de 6 à 7 heures dans ces conditions.

La Figure 2 et la photographie *a*, planche B, illustrent l'aspect d'un chromatogramme après séparation bidimensionnelle d'un mélange complexe de bases et nucléosides.

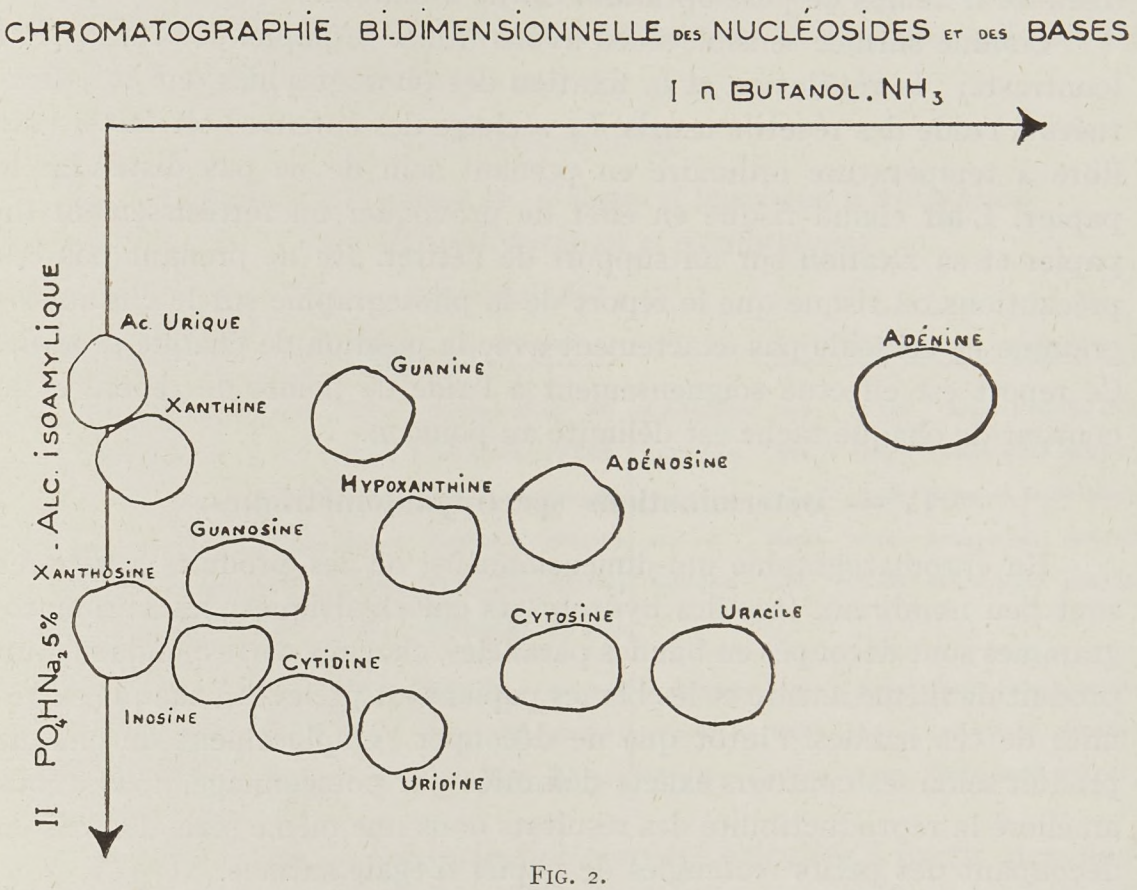


FIG. 2.

B. — Localisation des produits séparés.

La détection des composés sur les chromatogrammes a été effectuée par photographie en lumière ultra-violette d'après la méthode de MARKHAM et SMITH (177) mettant à profit l'absorption des composés puriques et pyrimidiques dans la région de 260 mμ.

Dans nos premiers essais, la source d'ultra-violet était constituée par une lampe de quartz à vapeur de mercure fonctionnant sous basse pression (pour lumière de WOOD) complétée par les 2 filtres préconisés par les auteurs. Mais l'intense radiation calorifique de la source lumineuse rendait très vite inutilisable le filtre liquide sulfates de nickel et de cobalt. Ce dispositif fut ultérieurement remplacé par une lampe tube « germicide » (Mazda TG-16), riche en radiations dans la région de 260 mμ et ne dégageant aucune chaleur appréciable. Au filtre liquide

sulfates de nickel et cobalt nous avons substitué un filtre Corning n° 9863 (« red purple corex A ») sélectionnant les radiations entre 230 et 420 mμ. L'emploi du filtre à chlore gazeux supprime une fraction importante des radiations au-delà de 300 mμ. Les fenêtres de quartz du dispositif filtrant présentent un diamètre utile de 7 cm projetant à une distance de 1, m 30 une plage lumineuse homogène de 0,40 × 1 m permettant ainsi de photographier simultanément plusieurs chromatogrammes. A cette distance le temps de pose optimum est de 1 minute.

Comme surface sensible nous avons utilisé le papier LUMIÈRE RVI (contraste) ; la révélation et la fixation des photographies ont été effectuées à l'aide des réactifs usuels. Le séchage des épreuves est fait à l'air libre à température ordinaire en prenant soin de ne pas distendre le papier. L'air chaud risque en effet de provoquer un rétrécissement du papier et sa fixation sur un support de l'étirer. En ne prenant pas ces précautions on risque que le report de la photographie sur le chromatogramme ne coïncide pas exactement avec la position de chaque produit. Ce report est effectué soigneusement à l'aide de points de repère et le contour de chaque tache est délimité au poinçon.

C. — Déterminations spectrophotométriques.

En chromatographie uni-dimensionnelle, où les produits à séparer sont peu nombreux (cas des hydrolysats chlorhydriques), les chromatogrammes sont découpés en bandes parallèles, chacune correspondant à un produit de même nature et les blancs papier sont prélevés à chaque extrémité de ces bandes. Plutôt que de découper l'emplacement de chaque produit selon ses contours exacts délimités par poinçonnage, nous avons amélioré la reproductibilité des résultats dans une même série d'essais en découpant des petits rectangles de papier d'égale surface.

En chromatographie bi-dimensionnelle le problème du prélèvement des « blancs » s'est révélé plus complexe. Nous avons, selon la surface des produits à doser, prélevé en 2 endroits distincts du chromatogramme, des « blancs » de surface telle qu'ils correspondaient à la tache la plus large, toutes les autres taches étant découpées ensuite par rapport à cette surface maxima. On prenait ensuite comme absorption de base la valeur moyenne des 2 blancs papier à chaque longueur d'onde caractéristique. Dans presque tous les cas, il s'est révélé nécessaire de répartir les taches en fonction de leur surface, et de déterminer la valeur du « blanc » pour chaque catégorie.

Après avoir été découpés et déposés dans des tubes à essai, les produits sont élués par 5 cm^3 d'HCl 0,1N le contact étant maintenu, avec agitation fréquente, pendant au moins 24 heures. Pour certains composés de faible solubilité tels que la guanine, la xanthine, les nucléotides pyrimidiques, il est préférable de porter le temps d'élution à 36 heures.

Toutes les mesures ont été faites en cuves de quartz de 1 cm² de section au spectrophotomètre Unicam (SP 600) dans la région du spectre comprise entre 220 et 290 mμ. Dans tous les cas où la nature du produit à doser était connue, les lectures des densités optiques ont été faites 5 mμ en deça et au delà de la longueur d'onde maximum.

Le calcul des concentrations a été effectué à partir des densités optiques mesurées et du coefficient d'extinction moléculaire caractéristique de chaque composé au maximum d'absorption. Nous indiquons ci-dessous la valeur des coefficients d'extinction moléculaire qui ont été appliqués dans nos calculs.

TABLEAU X

Coefficient d'extinction moléculaire et maximun d'absorption des composés puriques et pyrimidiques

dans HCl 0.1N

Dérivés		λ max	$\varepsilon_{\lambda max}$	AUTEURS		λ max	$\varepsilon_{\lambda max}$	AUTEURS
PURIQUES	AC. ADÉNYLIQUE	258.260	13.900	Marrian et coll. 1951 (182)	AC. GUANYLIQUE	257	11.800	Marrian et coll. 1951 (182)
	ADÉNOSINE	260	14.200	Cohn et Volkin 1953 (60)	GUANOSINE	256	13.300	Hurlbert et coll. 1954 (113)
	INOSINE	247	13.300	Kalckar 1947 (122)	XANTHOSINE	262,5	9.800	Magasanick. Brooke 1954 (170)
	ADÉNINE	260.262,5	13.000	Crosbie et coll. 1953 (63)	GUANINE	249.252	11.000	Loring et coll. 1952 (163)
	HYPOXANTHINE	248.250	10.900	Kream. Chargaff 1952 (143)	XANTHINE	262	9.680	DiCarlo et coll. 1952 (73)
	AM_5P. ADP. ATP	260	14.100	Hurlbert et coll. 1954 (113)				
PYRIMIDIQUES	AC. CYTIDYLIQUE	278	12.700	Ploeser. Loring 1949 (206)	AC. URIDYLIQUE	260.262	9.900	Ploeser. Loring 1949 (206)
	CYTIDINE	278	13.000	Loring et coll. 1952 (163)	URIDINE	260.262	9.900	Loring et coll. 1952 (163)
	CYTOSINE	275	11.000	Crosbie et coll. 1953 (63)	URACILE	259.260	7.900	Crosbie et coll. 1953 (63)

Pour le DPN, les concentrations ont été calculées à partir des densités optiques à 260 mμ et du coefficient d'extinction moléculaire de l'adénine à cette longueur d'onde. Quant à la xanthosine, pour laquelle nous avons vérifié que le maximum d'absorption en milieu chlorhydrique 0,1N se situe, comme pour la xanthine, à 262,5 mμ, nous lui avons attribué à cette longueur d'onde le coefficient de 9 800 très proche de celui de la xanthine (9 680) dans les mêmes conditions d'acidité. Cette valeur de 9 800 est celle qui a été indiquée par MAGASANIK et BROOKE à pH 6,2 et à 250 mμ (170).

Marqueurs.

Les valeurs de Rf des composés puriques et pyrimidiques dans les divers systèmes solvants utilisés, ont été déterminées le plus souvent à partir de produits du commerce : les acides adénylique, guanylique, cytidylique, uridylique, l'AM_5P, ADP, ATP et IM_5P étaient des produits Sigma Chem C° ; uridine, uracile, cytidine et hypoxanthine provenaient

des Établissements Hoffmann-La Roche, adénosine, guanosine de B.D.H. Laboratories, guanine et xanthine de Ashe.

Les échantillons de DPN et de cytosine nous ont été fournis par M. Coïc, Directeur de la Station de Physiologie végétale à l'I. N. R. A., ceux de xanthosine, d'inosine de TPN et ITP par M. le Professeur Mandel auxquels nous adressons nos remerciements. Chaque composé a été utilisé comme marqueur dans le solvant correspondant à une concentration approximative de 50 γ/10 µl après avoir été mis en solution selon les cas soit dans l'eau, soit en milieu chorhydrique ou ammoniacal dilué.

A maintes reprises, les composés marqueurs ont été préparés à partir d'ARN soumis à diverses conditions d'hydrolyse. Un mélange des 4 ribomononucléotides a été obtenu à partir d'un hydrolysat d'ARN par KOH 1N 15 heures à température ordinaire, neutralisé ensuite à froid par l'acide perchlorique. Les 2 bases puriques et les 2 nucléotides pyrimidiques libérés à partir de l'ARN par traitement chlorhydrique (HCl 1N, 1 heure à 100°C) ont été utilisés en mélange comme marqueurs. Enfin l'hydrolyse formique en tube scellé à 175°C a permis d'obtenir un mélange des 4 bases, de xanthine et hypoxanthine et, à une concentration plus faible, de cytidine et d'uridine.

Chacun des hydrolysats ainsi préparés présente l'avantage d'être pratiquement dépourvu de sels et donne des résultats satisfaisants dans l'un ou l'autre des solvants utilisés. Il est en effet facile, avant d'effectuer la chromatographie, d'éliminer du papier par séchage l'eau ou les acides chlorhydrique et formique.

D. — Identification des composés inconnus.

A plusieurs reprises, au cours de notre travail, et principalement lors de la chromatographie bi-dimensionnelle des nucléotides, nous avons eu l'occasion de mettre en évidence certains composés absorbant dans l'ultraviolet et dont les caractéristiques chromatographiques et spectrales différaient de celles des dérivés puriques ou pyrimidiques habituellement rencontrés.

L'identification de ces composés inconnus a pu être établie dans certains cas après avoir déterminé et comparé entre elles certaines de leurs caractéristiques physiques ou chimiques : spectre d'absorption, comportement chromatographique dans certains solvants, nature de la base constituante, teneur éventuelle en phosphore, réaction donnée avec le métapériodate etc. Voici les techniques expérimentales qui ont été mises en œuvre à cet effet :

— L'établissement du spectre permettant de déterminer les longueurs d'onde d'absorption maximum et minimum a constitué une opération relativement facile lorsque la concentration du produit isolé était

suffisante et a été effectué dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour les produits connus. Dans certains cas les caractéristiques spectrales ont été établies comparativement après élution acide (HCl 0,1 N) ou alcaline (NaOH 0,1N). Lorsque le produit à identifier se trouvait à trop faible concentration sur le chromatogramme, des taches identiques étaient découpées puis réunies dans un même tube à essai et éluées par un faible volume.

La détermination des caractéristiques chimiques a présenté par contre des difficultés plus grandes du fait de la très faible concentration sur les chromatogrammes des composés à étudier ; dans tous les cas il a été nécessaire d'isoler le produit en quantité telle que son analyse qualitative et quantitative devienne possible.

Dans quelques rares cas, le produit a pu être séparé en chromatographie uni-dimensionnelle et des élutions ont pu alors être effectuées directement sur la bande de papier où le composé était localisé. Mais le plus souvent, il a été nécessaire de procéder à une nouvelle chromatographie des éluats ainsi obtenus dans un second solvant permettant de séparer le composé étudié des autres constituants de Rf identique ou voisin en 1re dimension. A plusieurs reprises il s'est révélé préférable d'effectuer une série de chromatogrammes à 2 dimensions puis de prélever sur chaque exemplaire le produit à identifier.

Dans ces conditions, les taches ont été découpées, réunies dans un erlen et éluées soit par l'eau, soit par HCl 0,01 N, de préférence vers 10-15°C. Il est arrivé en effet que certains composés à groupements labiles étaient hydrolysés en cours d'opération malgré ces précautions. Pour les mêmes raisons, la concentration des éluats a toujours été faite sous vide en présence de P_2O_5 et à basse température.

C'est à partir de ces éluats concentrés qu'ont pu être effectuées diverses déterminations telles que le dosage du phosphore total, l'identification de la base constituante libérée après hydrolyse, et le comportement chromatographique du produit étudié dans d'autres solvants.

Dosage du Phosphore total.

La détermination a été effectuée par la micro-méthode colorimétrique de Briggs après minéralisation sulfo-nitrique. On a dû pour certains produits tenir compte également de la teneur des éluats en orthophosphate, celui-ci étant insuffisamment éliminé en première dimension dans le Butanol 3°-HCl 0,3 N et demeurant sur les chromatogrammes après le traitement au Propanol-ammoniacal. Les résultats analytiques ont parfois mis en évidence la libération de groupements phosphate labiles au cours des opérations d'élution et de concentration.

Identification de la base constituante.

Une autre fraction de l'éluat est par ailleurs soumise à l'hydrolyse dans 2 conditions après avoir été préalablement concentrée sous vide à sec : une première hydrolyse de 1 heure à 100°C par HCl libère adénine ou guanine si le composé inconnu est de nature purique ; en soumettant au contraire le produit à l'action de l'acide formique concentré à 175°C pendant 2 heures en tube scellé (259), on libère non seulement les bases puriques mais également la cytosine ou l'uracile si le composé est de nature pyrimidique. Les hydrolyses chlorhydriques ont été effectuées dans des petits tubes de verre ordinaire, les hydrolyses formiques dans des tubes scellés à parois épaisses capables de résister à la pression interne pendant la durée de l'opération. Malgré son incontestable avantage, l'hydrolyse des constituants pyrimidiques par l'acide perchlorique 12 N à 100°C en tube non scellé (183) n'a pu être mise à profit dans nos conditions expérimentales, par suite de la faible concentration des produits analysés et de l'impossibilité d'éliminer ultérieurement l'excès d'acide perchlorique pour l'examen chromatographique des hydrolysats.

Les bases libérées selon les conditions de l'hydrolyse ont été identifiées en soumettant les hydrolysats chlorhydriques ou formiques à la chromatographie bi-dimensionnelle dans le système *n*-butanol-eau-NH_3 puis PO_4HNa_2 5 p. 100-alcool isoamylique, la nature de la base étant encore précisée par ses caractéristiques spectrales après examen des éluats au spectrophotomètre.

Comportement chromatographique.

Les renseignements fournis par les diverses déterminations rapportées précédemment ont le plus souvent permis de caractériser le produit isolé. Son identité a pu parfois être encore précisée en déterminant les valeurs de Rf du produit considéré dans certains solvants et en les comparant avec celles rapportées par d'autres auteurs comme il sera indiqué plus loin. Ces essais chromatographiques ont été effectués sur une partie aliquote de l'éluat préalablement concentré.

Différenciation des nucléosides 3' et 5' phosphates.

La chromatographie bi-dimensionnelle des composés nucléotidiques a permis la séparation des nucléosides 3' P et de leurs isomères où l'acide phosphorique estérifie l'hydroxyle en position 5 du ribose. Outre leur différence de comportement dans les solvants utilisés, ces nucléotides ont pu être également différenciés et caractérisés en les soumettant à l'oxydation périodique qui est à la base de la méthode analytique proposée par BUCHANAN et coll. (33) et dont nous rappelons le principe : le produit

étudié est oxydé par le métapériodate de sodium en solution aqueuse après quoi l'excès de périodate et d'iodate est réduit par SO_2 ; l'aldéhyde formée est mise en évidence par le réactif de SCHIFF. Dans ces conditions les nucléosides 5'P donnent une coloration pourpre alors que leurs isomères 3'P ne donnent rien.

La réaction précédente a été appliquée directement sur le papier après détection des produits en lumière ultra-violette, l'oxydation par le périodate étant effectuée à 60°C en atmosphère d'azote. Le chauffage ultérieur à 60°C permettant d'activer le développement de la coloration ainsi que l'indiquent les auteurs n'a pas donné de résultats satisfaisants. Les colorations ont été obtenues dans de meilleures conditions à température ordinaire.

VII. — MÉTHODES ANALYTIQUES

A. — Méthodes colorimétriques.

Toutes les déterminations colorimétriques ont été effectuées à l'aide de l'électrophotomètre de MEUNIER.

DOSAGE DU PHOSPHORE

Nous avons utilisé la microméthode colorimétrique de BRIGGS (17-31) adaptée par MACHEBOEUF et DELSAL (169). Le P total a été déterminé après minéralisation sulfo-nitrique, le P ortho directement sur les extraits et le P labile par différence après hydrolyse pendant 7 minutes au bain marie à 100°C en milieu chlorhydrique 1N.

Dans les cas où la quantité de matière organique à minéraliser était trop importante (levures totales, résidus après hydrolyse alcaline de la fraction « nucléique », précipité ADN-protéines), nous avons pratiqué la minéralisation nitro-zincique de THIVOLLE (251).

Les mesures colorimétriques ont été effectuées en écran orangé.

DOSAGE DES PENTOSES

RIBOSE. — Il a été dosé par la méthode à l'orcine de BIAL-MEJBAUM (186), la coloration étant mesurée en écran rouge. La réaction est fortement influencée par le degré de pureté de l'orcine utilisée. Des essais de purification par cristallisation fractionnée de solutions d'orcine dans le benzène n'ont pas permis d'obtenir un produit suffisamment pur. Nous avons obtenu cependant des résultats satisfaisants et reproductibles avec l'orcine MERCK.

Ribose des constituants acido-solubles. — Le temps de chauffage de 20 minutes de la technique originale a été porté à 45 minutes. Ainsi que

l'ont montré Albaum et Umbreit (2) le développement de la coloration verte est plus lent avec les composés phosphorylés en 3' qu'avec ceux en 5' (ribose phosphates et nucléotides). En soumettant les liquides à doser à une durée de chauffage de 45 minutes, on peut déterminer quantitativement la teneur en ribose purique, le pentose de nature pyrimidique n'étant pas libéré dans ces conditions. Les déterminations ont été faites par rapport à une courbe étalon établie avec des concentrations variées de *d*-ribose dans les mêmes conditions expérimentales.

Ribose de l'acide ribonucléique. — Comme précédemment, la durée de chauffage a été portée à 45 minutes, ces conditions se trouvant justifiées par le fait que la réaction intéresse exclusivement les nucléotides puriques de l'ARN où l'acide phosphorique estérifie le C_3 du ribose. Les intensités de coloration ont été rapportées à une courbe étalon établie à partir d'un échantillon commercial d'ARN déprotéinisé et dont le rapport purines/pyrimidines était égal à 1,40. Nous verrons plus loin que la proportion des nucléotides puriques dans l'ARN utilisé comme étalon intervient dans l'expression des résultats analytiques.

Sur les extraits trichloracétiques ou perchloriques obtenus selon la technique de Schneider, la détermination de l'ARN par le ribose a été faite sans appliquer la correction qui tient compte de la réaction positive donnée par le désoxyribose dans ces conditions ; par suite de la très faible teneur des levures en ADN, l'erreur ainsi commise reste inférieure aux erreurs expérimentales.

Remarque. — Dans tous les cas où la méthode à l'orcine a été appliquée, qu'il s'agisse des extraits acido-solubles des levures ou de la solution contenant les mononucléotides de l'ARN hydrolysé, on a constaté que les liquides de réaction après chauffage au bain-marie présentaient un aspect plus ou moins trouble et une coloration vert olive s'atténuant légèrement pas refroidissement mais ne permettant pas une mesure colorimétrique directe. Des résultats satisfaisants et reproductibles ont pu néanmoins être obtenus pas centrifugation énergique des liquides avant passage à l'électrophotomètre : en opérant ainsi on sépare un liquide limpide d'un beau vert et un précipité très ténu violet-brun ; nous n'avons pu déterminer la nature de ce précipité parasite qui ne se forme pas lorsque la réaction est obtenue à partir de ribose pur ou de l'ARN servant à l'étalonnage.

La formation de substances parasites colorées en brun a été signalée également par Euler et Hahn (86) dans la détermination colorimétrique du ribose de l'ARN de levure par la phloroglucine.

Désoxyribose. — Il a été déterminé par la réaction de Dische à la diphénylamine (80) sur les extraits trichloracétiques ou perchloriques ayant pour origine le précipité ADN-protéines obtenu dans le fractionne-

ment de SCHMIDT-THANNHAUSER. La coloration bleue a été mesurée en écran orangé et les absorptions rapportées à une courbe étalon établie à partir d'un ADN polymérisé isolé et purifié à partir de thymus.

Nous avons obtenu un développement normal de la coloration bleue avec S. cerevisiae (levures de boulangerie et de brasserie) ; par contre, avec les levures développées sur moût de raisin ou de pommes, la réaction de DISHE n'a pu être prise en considération par suite de la teinte bleu-vert ou vert obtenue.

ALLANTOINE, ACIDE ALLANTOIQUE, ACIDE GLYOXYLIQUE. — La déterminationcolorimétrique de ces dérivés uriques a été pratiquée en mettant à profit la méthode proposée par CHRISTMAN (54) pour doser l'allantoïne dans le sang.

L'acide glyoxylique formé par hydrolyse de l'allantoïne est couplé avec la phénylhydrazine et l'hydrazone formée est oxydée en milieu fortement acide par le ferricyanure de potassium pour donner un produit d'oxydation coloré en rose. L'allantoïne est hydrolysée quantitativement en acide allantoique en milieu alcalin (277) ce dernier étant lui-même transformé en acide glyoxylique et urée par hydrolyse acide.

Les déterminations ont été faites sur des extraits trichloracétiques de levures autolysées riches en bases puriques et pyrimidiques et acides aminés. Nous avons vérifié que adénine, guanine, hypoxanthine, xanthine et uracile ne donnaient pas la réaction. Par contre, et ainsi que les auteurs l'ont signalé, le glycocolle donne une légère coloration rose et l'acide urique une réaction positive correspondant environ au tiers de celle donnée par le même poids d'allantoïne.

Appliquée directement aux extraits trichloracétiques, et dans les conditions prescrites par CHRISTMAN et coll. (54) la réaction permet de déterminer la concentration en acide glyoxylique libre ; après hydrolyse chlorhydrique on obtient la somme (acide allantoïque + acide glyoxylique) ; et en combinant les hydrolyses alcaline et acide, on détermine l'ensemble (allantoine + acide allantoïque + acide glyoxylique). La courbe d'étalonnage a été établie à partir d'allantoïne hydrolysée d'abord en milieu alcalin puis en milieu acide dans les mêmes conditions expérimentales. Les déterminations colorimétriques ont été effectuées en écran vert. La réaction suit la loi de BEER entre 10 et 50 γ.

ACIDE URIQUE. — Nous avons utilisé la technique expérimentale décrite par BLOCK et GEIB (22) pour le sang, permettant de doser l'acide urique par l'intermédiaire de la coloration bleue donnée par l'acide arsenophosphotungstique (réactif de BENEDICT (19)) en présence du réactif urée-cyanure de CHRISTMAN-RAVWITCH (55) stabilisant la coloration. Les déterminations ont été effectuées en écran orangé, sur des défécats trichloracétiques de levures autolysées, et rapportées à une courbe étalon

obtenue à l'aide d'une solution standard d'acide urique préparée selon les prescriptions de BUCHANAN et coll. (32). La coloration suit la loi de BEER entre 40 et 280 γ d'acide urique.

B. — Détermination spectrophotométrique des acides nucléiques.

Parallèlement au dosage du phosphore et des pentoses des déterminations spectrophotométriques ont été faites sur les divers extraits acides obtenus dans les conditions décrites antérieurement au cours du fractionnement des constituants nucléiques. L'examen a porté d'une part sur les extraits contenant la somme ARN + ADN préparés selon le principe de SCHNEIDER, d'autre part sur les 2 fractions séparées dans les conditions de SCHMIDT-THANNHAUSER, l'une contenant les 4 mononucléotides acido-solubles de l'ARN, l'autre résultant de l'extraction acide du précipité ADN-protéines.

Si l'acide trichloracétique préconisé dans les méthodes originales n'interfère pas avec les dosages chimiques des pentoses et du phosphore, il n'en est plus de même dans les déterminations spectrophotométriques : l'importance de son propre fond spectral dans la région de 260 mμ et la décomposition partielle qu'il subit lors de l'extraction à chaud, rendent son emploi très délicat. Aussi a-t-on proposé (198) comme agent d'extraction l'acide perchlorique qui possède les mêmes propriétés de précipitation vis-à-vis des protéines sans présenter d'absorption notable à 260 mμ.

La détermination spectrophotométrique de l'ARN a été pratiquée indifféremment à partir d'extraits trichloracétiques ou perchloriques. En effet, étant donné la teneur élevée des cellules en ARN, la concentration en acide nucléique des divers extraits obtenus a toujours nécessité une dilution importante pour permettre une lecture correcte des densités optiques. Or les dilutions ont été faites dans l'acide chlorhydrique 0,1 N, en prenant soin d'établir la courbe d'étalonnage dans les mêmes conditions de dilution.

Enfin, les déterminations de l'ADN ont été faites à partir d'extraits perchloriques, dilués en conséquence par HCl 0,1 N.

Les densités optiques mesurées au spectrophotomètre (Unicam SP 600) ont été rapportées à des courbes étalons établies à 260 mμ pour l'ARN à l'aide d'une préparation isolée de levure et déprotéinisée, à 265 mμ pour l'ADN en utilisant comme standard une préparation extraite du thymus. Nous avons en effet vérifié au préalable dans les mêmes conditions expérimentales que l'absorption maximum de l'ARN se situe à 260 mμ, celle de l'ADN étant décalée à 265 mμ.

C. — **Autres méthodes.**

Dosage de l'azote total. — Il a été déterminé uniquement dans le cas des levures non autolysées par la méthode classique de KJELDAHL. Nous avons constaté que les résultats étaient identiques, que le catalyseur SO_4K_2 — SO_4Cu soit additionné ou non d'oxyde de mercure, à condition que la minéralisation à partir du moment où les liquides sulfuriques sont décolorés, soit prolongée au moins 4 heures. Ces conditions permettent la destruction totale des noyaux puriques et pyrimidiques.

RÉSULTATS OBTENUS ET DISCUSSION

PREMIÈRE PARTIE

LES CONSTITUANTS PURIQUES ET PYRIMIDIQUES DES LEVURES

RÉSULTATS OBTENUS

Composition des levures en purines et pyrimidines totales.

L'hydrolyse chlorhydrique des levures totales a pour effet de libérer quantitativement l'adénine et la guanine des combinaisons organiques puriques où elles se trouvent engagées, qu'il s'agisse des nucléosides et nucléotides libres préexistants ou des polynucléotides de l'ARN. Dans les mêmes conditions les constituants cellulaires pyrimidiques sont hydrolysés quantitativement en mononucléotides. C'est ainsi que les polynucléotides pyrimidiques de l'ARN conduisent quantitativement aux acides cytidylique (CM_3P) et uridylique (UM_3P), une faible fraction étant déphosphorylée en cytidine et uridine.

Mais les levures contiennent également des nucléotides pyrimidiques libres mono, di ou triphosphorylés qui, dans les conditions d'hydrolyse, conduisent aux mononucléotides isomères des précédents, les uridine et cytidine 5' phosphates. Or, après chromatographie des hydrolysats dans le solvant Butanol 3°-HCl 0,8 N, ces mononucléotides n'occupent pas sur le papier la même position que leurs isomères d'origine ribonucléique mais se confondent avec les nucléosides correspondants cytidine et uridine, ainsi qu'en témoignent les valeurs de Rf suivantes :

cytidine.....	0,40	CM_5P.....	0,43	CM_3P.....	0,48
uridine.....	0,68	UM_5P.....	0,72	UM_3P.....	0,81

Lors de la détermination quantitative des pyrimidines totales des levures il a donc été nécessaire de tenir compte des uridine et cytidine 5' phosphates libérés par hydrolyse en même temps que de leurs isomères 3' phosphates correspondants. En conséquence, les déterminations spectrophotométriques ont été effectuées après découpage et élution des zones de papier représentant respectivement la somme (UM_3P, UM_5P, uridine) et (CM_3P, CM_5P, cytidine). Pour la même raison les calculs ont été faits en utilisant comme coefficient d'extinction moléculaire 9 900 pour les composés dérivés de l'uracile et 12 700 pour ceux dérivés de la cytosine.

Nous avons groupé dans le tableau XI suivant les résultats ainsi obtenus sur plusieurs levures différant entre elles à la fois par le genre et les conditions de développement, les teneurs respectives en N total reflétant les différences de composition. Les teneurs en N purique et N pyrimidique ont été déterminées par calcul à partir des concentrations moléculaires obtenues par spectrophotométrie.

Tableau XI

Composition de diverses levures en purines et pyrimidines totales

	S. cerevisiae Hansen						T. utilis	S. carlsbergensis		S. cerev. var. ellipsoïdeus		
	Boulangerie				Brasserie	Distillerie		Cidre		Vin		
	1	12	13	14	10	9	8	3	7	2	5	6
	µM / 100 gr levure (poids sec)											
GUANINE	7.630	4.040	3.970	3.680	5.110	5.530	3.250	1.540	2.830	7.000	3.660	3.440
ADÉNINE	8.660	4.680	4.900	4.390	6.500	5.400	3.740	1.970	3.500	7.600	4.080	3.930
CYTOSINE	5.360	2.750	2.670	2.500	3.625	3.400	2.130	1.160	2.000	4.700	2.210	2.640
URACILE	7.650	3.920	4.180	4.000	5.030	4.910	2.805	1.750	2.740	6.500	3.390	3.350
	mg / 100 gr levure (poids sec)											
GUANINE	1.152	610	599,5	556	771,5	835	491	232,5	427,5	1057	553	519,5
ADÉNINE	1.169	632	661,5	593	877,5	729	504,5	266	472,5	1026	551	530,5
CYTOSINE	595	305	296,5	277,5	402,5	377,5	236,5	129	220	522	245,5	293
URACILE	857	439	468	448	563,5	550	313,6	196	307	728	380	375
	N total (mg p 100 gr levure poids sec)											
	10.450	7.140	6.720	6.570	9.200	8.380	6.430	3.430	5620	8.400	6.540	6.190
	. N p 100 de N total											
N PURIQUE	10,90	8,54	9,22	8,58	8,82	9,12	7,60	7,14	7,87	12,15	8,27	8,32
N PYRIMIDIQUE	4.20	3,15	3,23	3,30	3,18	3,34	2,60	2,84	2,84	4,51	2,86	3,30
N PUR + PYRIMID	15,10	11,69	12,45	11,88	12 -	12,46	10,20	9,98	10,71	16,66	11,13	11,62

Si on exprime les teneurs en guanine, adénine, cytosine et uracile en µM ou en mg/100 g poids sec, on observe des différences sensibles parfois très importantes entre les levures examinées. C'est ainsi que les teneurs en purines et pyrimidines de la levure 1 sont plus de 4 fois supérieures à celles de la levure 3.

Si au contraire, compte tenu de la teneur en azote de chaque base, on exprime l'azote purique ou pyrimidique en p. 100 de l'azote total, les différences constatées sont très fortement atténuées ; pour l'azote purique exception faite des valeurs extrêmes 7,14 et 12,15, les pourcentages oscillent autour d'une valeur moyenne de 8,5 ; quant à l'azote pyrimidique, il représente en moyenne 3,3 p. 100 de l'azote total, si l'on ne tient pas compte des pourcentages extrêmes de 2,6 et 4,51. On notera d'ailleurs que les proportions d'azote purique et pyrimidique les plus faibles sont observées pour les levures les plus pauvres en azote total et inversement qu'aux teneurs les plus élevées en azote total correspondent des pourcentages élevés en N purique et pyrimidique.

D'après nos résultats, les cellules contiennent donc au maximum 9 et au minimum 5,7 fois plus d'azote protéique que d'azote purique et pyrimidique ; or, comme une très forte proportion de celui-ci est d'origine ribonucléique, il apparaît que la teneur des levures en constituants nucléiques est dans une certaine mesure fonction de leur teneur en protéines.

Si l'on fait abstraction de ces cas extrêmes dans lesquels la synthèse protéique a été soit favorisée (levures 1 et 2) soit défavorisée (levure 3), il semble que, pour des conditions de culture assurant un développement normal des cellules, l'azote purique et pyrimidique rapporté à l'azote total, représente une fraction azotée sensiblement constante voisine de 11,5 p. 100. Le taux moyen d'azote purique de 8,5 p. 100 de l'azote total qui a été obtenu dans nos conditions expérimentales est très voisin de celui indiqué par DIRR et DECKER (79) (8,7 p. 100) à partir d'un nombre plus limité d'échantillons et à l'aide d'une méthode exclusivement chimique.

I. — CONSTITUANTS CELLULAIRES ACIDO-SOLUBLES

A. — Purines et pyrimidines acido-solubles totales.

L'hydrolyse chlorhydrique libérant quantitativement les 2 bases puriques et les 2 nucléotides pyrimidiques n'a pu être appliquée aux constituants cellulaires acido-solubles en raison de leur faible concentration et surtout des difficultés rencontrées pour éliminer l'acide trichloracétique des extraits ainsi obtenus, en vue de leur analyse chromatographique.

Les résultats concernant la composition de diverses levures en purines et pyrimidines acido-solubles qui sont rapportés dans le tableau XII

TABLEAU XII

Composition de diverses levures en Purines et Pyrimidines Acido-solubles

	S. Cerevisiae Hansen								T. utilis	S. carlsbergensis		S. cerevisiae ellipsoideus	S. oviformis
	Boulangerie						Brasserie	Distillerie		Cidre		Vin	
	11	12	13	14	15	18	10	9	8	3	7	6	4
	µM / 100 gr levure (poids sec)												
GUANINE	620	690	460	400	450	400	440	630	420	100	110	120	380
ADÉNINE	1.450	1.640	1.480	1.330	1250	1500	2.000	980	1060	490	430	360	580
CYTOSINE	290	390	240	340	340	350	325	160	110	110	40	50	90
URACILE	1.000	1220	940	1010	1160	1270	1000	760	225	200	260	220	220
	p 100 de la base totale												
GUANINE	16,1	17	11,6	10	9,4	8,7	8,6	11,3	12,9	6,5	6,7	3,4	9,8
ADENINE	32,2	35	30,2	30,3	23,8	28,4	30,7	18,1	28,3	24,8	12,2	19,2	14,1
CYTOSINE	11,2	14,1	9	13,6	11,2	11,7	9	4,7	5,1	9,4	2	1,8	3,5
URACILE	28,5	31,1	22,4	25,2	22,1	26,2	20	15,5	8	11,4	9,4	6,6	6,3

ont été obtenus par différence entre les valeurs relatives aux cellules entières qui viennent d'être indiquées et celles fournies par l'analyse chromatographique des hydrolysats chlorhydriques obtenus à partir de la fraction nucléique insoluble des cellules.

Ces résultats font apparaître des différences de composition très importantes entre les diverses levures puisque, pour 100 g de poids sec, les échantillons examinés contiennent de 100 à 690 µM de constituants acido-solubles à base de guanine, de 360 à 2 000 µM de constituants renfermant de l'adénine, de 40 à 390 pour la cytosine et de 200 à 1 270 pour l'uracile. Les teneurs les plus élevées se rencontrent chez *S. cerevisiae* Hansen ; elles sont aussi assez voisines entre elles bien que les levures de ce groupe aient été récoltées dans des conditions et à partir de milieux différents. A l'opposé, *S. carlsbergensis*, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *S. oviformis* et à un degré moindre *T. utilis* forment une autre catégorie de levures notablement plus pauvres en constituants puriques et pyrimidiques libres.

Et cependant, indépendamment de ces différences et de ces variations et quelle que soit la levure, les rapports entre ces composés dans les cellules se révèlent sensiblement identiques. Dans tous les cas, les constituants dérivant de l'adénine sont quantitativement les plus importants, suivis de ceux à base d'uracile, puis des dérivés de la guanine et enfin de ceux renfermant de la cytosine.

Si les teneurs des cellules en purines et pyrimidines acido-solubles sont exprimées en p. 100 de la base totale correspondante, on constate, dans le cas de *S. cerevisiae* Hansen par exemple, que l'adénine acido-soluble libre et combinée représente environ 31 p. 100 de l'adénine totale, les proportions correspondantes étant de 26 p. 100 pour l'uracile, 11,5 p. 100 pour la guanine et 10,5 p. 100 environ pour la cytosine. Chez *S. carlsbergensis*, *S. oviformis* et *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, les pourcentages moyens correspondants sont respectivement de 15 pour l'adénine, 8,4 pour l'uracile, 6,6 pour la guanine et 4,1 pour la cytosine.

B. — Constituants puriques et pyrimidiques libres.

En conjuguant les méthodes d'analyse faisant appel à la précipitation par les sels d'argent et de plomb et à la chromatographie bidimensionnelle sur papier, il a été possible de déterminer la nature des divers constituants acido-solubles puriques et pyrimidiques préexistants à l'état libre dans les cellules. L'emploi de la spectrophotométrie a d'autre part permis leur détermination quantitative.

1. — Etude qualitative.

a) *Bases et nucléosides.*

La séparation des bases et des nucléosides en chromatographie bidimensionnelle n'a pas présenté de difficultés particulières et l'identification des produits séparés d'après leur Rf respectif dans chaque solvant a été précisée par leurs caractéristiques spectrales.

Il s'est cependant présenté un cas où l'identité du produit isolé n'a pu être précisée. Ce composé, précipité aussi bien par l'acétate mercurique que le nitrate d'argent, mais non par l'acétate basique de plomb, a été rencontré uniquement dans les extraits acido-solubles d'une levure de brasserie (*S. cerevisiae* Hansen n° 10). Son Rf dans le système *n*-butanol-NH_3 est supérieur à celui de l'adénine et égal à celui de la thymine, (R adénine = 1,28) alors que dans le solvant de CARTER, il donne une tache de Rf = 0,65. Son maximum d'absorption après élution dans HCl 0,1 N se situe à 260 mμ celui de la thymine étant à 265 mμ dans les mêmes conditions. Il ne s'agit donc pas de thymine, comme le laissait prévoir d'ailleurs sa concentration relativement élevée. Nous avons supposé qu'il pouvait s'agir du dérivé thiométhyl de l'adénosine. En effet, selon SMITH et SCHLENK (236) ce composé présente un Rf de 0,76 dans le solvant phosphate-isoamylique, et de 0,62 (R adénine = 1,34) dans le butanol saturé d'eau ; mais le produit étudié ne donne pas la réaction à la ninhydrine effectuée selon les indications de CANTONI (38). Calculée à partir du coefficient moléculaire de l'adénine, sa concentration serait d'environ 2,4 μM/g de levure (poids sec). Le rapport $\Sigma 262/\Sigma 248$ des éluats dans HCl 0,1N est de 1,24, alors que pour l'adénine il est de 1,38. Il ne peut s'agir d'un produit d'oxydation enzymatique de l'adénine analogue à la 2-8 dihydroxyadénine isolée après action de la xanthine-oxydase du lait sur l'adénine (135) car l'absorption de ce composé très insoluble est minimum à 263 mμ à pH 7.

Nous nous proposons, lors d'essais ultérieurs, d'étudier plus complètement ce constituant cellulaire afin d'en établir son identité. La photographie *b2* (planche B) indique sa position en chromatographie unidimensionnelle dans le *n*-butanol-eau-NH_3 par rapport aux bases et nucléosides présents à ses côtés chez la levure de brasserie.

b) *Nucléotides.*

L'identification des composés nucléotidiques séparés par chromatographie bidimensionnelle, contrairement à celle des nucléosides et des bases, a présenté des difficultés sérieuses. Nous avons reproduit schématiquement dans la Figure 3 ci-dessous la répartition sur les chro-

matogrammes des divers nucléotides connus et inconnus présents dans la fraction cellulaire acido-soluble de *S. cerevisiae* Hansen ; on a vu en effet que, de tous les échantillons examinés, les levures de boulangerie et de brasserie étaient les plus riches en constituants acido-solubles et ce

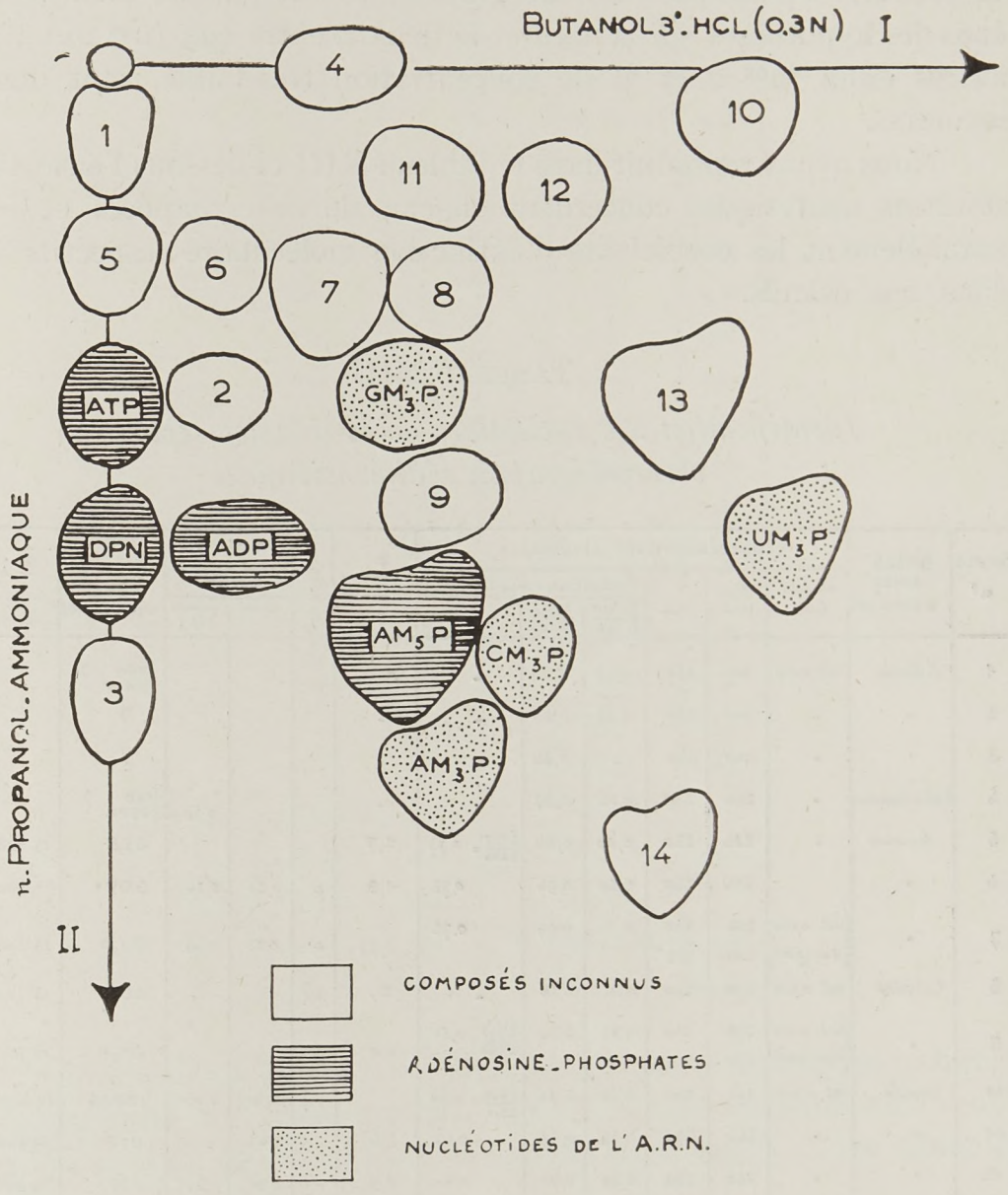


FIG. 3. — Chromatographie des Nucleotides libres des levures.

sont les extraits ayant ces levures pour origine qui se sont révélés les plus complexes en chromatographie bidimensionnelle. La position respective des adénosine mono, di et triphosphates, du DPN et des 4 nucléotides de l'ARN est indiquée et les composés devant être identifiés, au nombre de 14, sont affectés d'un numéro d'ordre.

Identification des nucléotides.

La mise en œuvre des techniques analytiques décrites en détail par ailleurs a permis de déterminer certaines caractéristiques physiques et chimiques des composés ainsi isolés et de préciser leur identité. Des 14 produits séparés par chromatographie, 10 ont pu être identifiés ; on a émis des hypothèses sur la nature de deux d'entre eux (nos 1 et 4), deux autres enfin (nos 2 et 3) de concentration très faible, sont demeurés inconnus.

Nous avons reproduit dans le tableau XIII ci-dessous l'ensemble des résultats analytiques concernant chacun de ces composés et indiqué parallèlement les coefficients d'extinction moléculaire respectifs utilisés dans nos calculs.

TABLEAU XIII

Identification des nucléotides acido-solubles séparés en chromatographie bidimensionnelle

Taches n°	Bases après hydrolyse	Caractéristiques spectrales : élution dans	λ max.	λ min.	Rapports aux λ caractéristiques : $\frac{E_{280}}{E_{260}}$	$\frac{E_{250}}{E_{260}}$		P Nucléoside	Périodate	R adénosine éthanol acétate NH4 µM 3,8 : trouvé	R adénosine éthanol acétate NH4 µM 3,8 : auteurs (37)	Nature du nucléotide	ε λ max. utilisé (HCl 0,1N)	ε λ max. selon
1	Adénine	HCl 0,01N	260	230	0,35	0,83	-	> 2				TPN ? DATP ?		
2	"	"	260	230	0,27	0,83	-	-				?		
3	"	"	260	230	-	0,82	-	-				?		
4	Adén+Guanine	"	260	230	0,62	0,97	-	-			0,30	FAD ? GDPM ?		
5	Guanine	"	256	230	0,60	0,94	$\frac{E_{245}}{E_{260}}$: 0,73	2,7				GTP	13.300	(229)
6	"		256	230	0,60	0,94	0,73	1,8	+	0,50	0,24	GDP	13.300	(229)
7	"	HCl 0,01N	255	230	0,70	0,94	0,72	0,93	+	0,50	0,43	GM_5P	13.300	(229)
		NaOH 0,01N	262	232										
8	Cytosine	HCl 0,01N	278	240	1,31	0,56	-	2.	+?			CDP	13.700	(229)
9	"	HCl 0,01N	278	240	1,83	0,50	$\frac{E_{260}}{E_{280}}$: 0,54	0,9	+			CM_5P	13.700	(229)
		NaOH 0,01N	270	245										
10	Uracile	HCl 0,01N	261	230	0,32	0,75	$\frac{E_{245}}{E_{261}}$: 0,56		+?	0,61	0,60	UDPAG	10.450	(37)
11	"	"	260	230	0,38	0,86	0,67	3,4		0,43		UTP	9.900	(229)
12	"	"	262	232	0,29	0,70	0,51	1,9	+?	0,81	0,40	UDP	9.900	(229)
13	"	HCl 0,01N	262	230	0,35	0,77	0,60	1,07	+	0,80	0,76 à 0,80	UM_5P	9.900	(229)
		NaOH 0,01N	262	240										
14	néant	HCl 0,01N eau	278	240					-			ac. orotique	6.560	(101)

Le tableau XIV indique d'autre part les caractéristiques chromatographiques, dans chacun des solvants utilisés, des nucléotides libres composant la fraction purique et pyrimidique acido-soluble des levures. L'identification de plusieurs de ces composés a été facilitée en tenant compte du comportement typique déjà signalé des adénosine-phosphates dans les 2 solvants employés.

Tableau XIV

Caractéristiques chromatographiques des nucléotides acido-solubles

Butanol 3i° - HCl 0,3N			n-Propanol - NH_3		
Spots n°	Nucléotides	R_f	Spots n°	Nucléotides	R acide adénylique
1	(TPN.DATP)?	0	4	(FAD.GDPM)?	0
3	?	0	10	UDPAG	0,08
5	GTP	0	1	(TPN.DATP)?	0,13
	DPN	0	11	UTP	0,18
	ATP	0,02	12	UDP	0,19
2	?	0,13	5	GTP	0,29
6	GDP	0,13	6	GDP	0,30
	ADP	0,18	8	CDP	0,32
7	GM_5P	0,28	7	GM_5P	0,34
4	(FAD.GDPM)?	0,28	13	UM_5P	0,47
	GM_3P	0,35		GM_3P	0,48
	AM_5P	0,36	2	?	0,48
11	UTP	0,38		ATP	0,50
	AM_3P	0,38	9	CM_5P	0,60
8	CDP	0,40		ADP	0,69
9	CM_5P	0,40		UM_3P	0,70
	CM_3P	0,48		DPN	0,75
12	UDP	0,54		AM_5P	0,82
14	acide orotique	0,65		CM_3P	0,85
13	UM_5P	0,69	3	?	0,95
10	UDPAG	0,77		AM_3P	1
	UM_3P	0,81	14	acide orotique	1,20

Outre les diverses caractéristiques physiques et chimiques indiquées dans le tableau XIII, plusieurs observations complémentaires sont venues préciser la nature de chacun des composés ainsi isolés. Nous allons les exposer :

Les propriétés spectrales des produits 1,2 et 3, la base qu'ils libèrent après hydrolyse, le fait qu'ils précipitent beaucoup plus faiblement par l'acétate de plomb que par le nitrate d'argent en milieu alcalin, sont autant d'indices qu'il s'agit bien de nucléotides dérivés de l'adénine.

Le composé n° 1 présente dans chaque solvant un Rf égal à celui du TPN ; mais compte tenu de son intensité sur les chromatogrammes et de l'importance quantitative du TPN dans les cellules, il est probable qu'il ne s'agit pas uniquement de ce coenzyme ; si on considère, qu'à l'image des triphosphates, son Rf est nul dans le solvant acide et qu'il

se déplace plus lentement que les triphosphates dans le solvant alcalin, on peut supposer que la tache 1 contient, outre le TPN, un nucléotide dérivé de l'adénine fortement phosphorylé tel que le diadénosine tétraphosphate (DATP) de KIESLING et MEYERHOF (134) peut-être identique au coenzyme isolé par OHLMEYER (199).

Le produit n° 2, de même Rf que les diphosphates dans le solvant acide, pourrait peut-être correspondre au coenzyme A, en supposant que sa migration plus lente que l'ADP dans le solvant alcalin, soit attribuable à une plus grande complexité de la molécule.

Quant *au produit n° 3*, de concentration plus faible encore, aucune hypothèse valable ne peut être formulée concernant sa nature.

Le composé n° 4 présent à la fois dans les extraits plombiques et argentiques, manifeste en lumière ultraviolette une fluorescence vert jaune rappelant celle des composés flaviniques ce qui, compte tenu de l'adénine qu'il donne par hydrolyse, permettrait de l'identifier au FAD. Mais le fait qu'il libère également de la guanine est l'indice qu'il contient un autre nucléotide qui serait peut-être le guanosine diphosphate mannose (GDPM) isolé de la levure par CABIB et LELOIR (36). Le fait qu'il ne se comporte pas en chromatographie comme son dérivé diphosphate (GDP produit 6) serait peut-être attribuable à la présence dans la molécule du radical glucidique. La trop faible concentration de la tache 4 n'a pas permis d'en faire une analyse plus complète.

Les *produits n^os 5, 6* et *7* respectivement les guanosine tri, di et mono 5' phosphates (GTP, GDP, GM_5P) se comportent de façon comparable aux adénosine-phosphates, leur migration dans chaque solvant étant d'autant plus lente que la molécule est davantage phosphorylée, le monophosphate 5' ayant en outre une vitesse de migration plus lente que son isomère 3', l'acide guanylique. Ces 3 composés présentent en lumière ultra-violette une fluorescence violette caractéristique des dérivés de la guanine dans le butanol3°-chlorhydrique. Chromatographié dans l'éthanol-acétate pH 3,8, l'éluat de la tache 6 (GDP) présente un R adénosine de 0,50, témoignant de son hydrolyse en GM_5P au cours de l'élution. Enfin la nature purique de ces guanosine 5' phosphates est confirmée par leur degré de précipitation selon le métal utilisé. Si on admet que la précipitation est totale par le nitrate d'argent à pH 8,3, en milieu acide l'acétate de plomb précipite environ 85 p. 100, le nitrate mercurique de 40 à 70 p. 100 et l'acétate mercurique de 30 à 65 p. 100 (résultats concernant la tache 7 : GM_5P). La faible concentration du composé 5 (GTP) n'a pas permis la réaction au périodate.

La nature pyrimidique des *produits n^os 8 et 9* identifiés respectivement comme étant les cytidine di et mono 5'-phosphates (CDP et CM_5P),

est mise en évidence par le fait que leur concentration dans les extraits argentiques est environ 4 fois plus faible que dans ceux obtenus après traitement par les acétates de plomb ou de mercure. Le comportement chromatographique de la tache 9 (CM_5P) est en accord avec les observations de Baddiley et Mathias (11) signalant que le cytidine 5' phosphate a un Rf plus faible (0,27) que son isomère 3' phosphate l'acide cytidylique (0,34) dans le propanol ammoniacal, ainsi que ceux de Merrifield et Woolley (187) qui indiquent les Rf suivants dans le butanol 3° chlorhydrique : CM_3P 0,51, CM_5P 0,43. On retrouve encore ici l'influence du degré de phosphorylation de la molécule et celle de l'emplacement sur le ribose de la liaison phosphoester. Le dérivé triphosphate correspondant n'a pas été mis en évidence en raison sans doute de sa trop faible concentration.

Les données analytiques concernant les *composés* nos *11, 12, et 10* permettent de les identifier respectivement aux dérivés tri et diphosphates de l'uridine 5' monophosphate (UM_5P) (tache 13) isomère de l'acide uridylique (UM_3P), leurs caractéristiques chromatographiques venant une nouvelle fois confirmer les observations faites pour les dérivés phosphates de l'adénosine, de la guanosine et de la cytidine. Leur nature pyrimidique est également confirmée par l'importance de leur précipitation par les divers métaux lourds.

Le *produit 10* a été identifié comme étant l'uridine diphosphate acétyl-glucose-amine (UDPAG) d'après ses diverses caractéristiques analytiques. Son R adénosine dans le solvant de Cabib et Leloir (36) correspond à celui indiqué par les auteurs. Le rapport P/nucléoside n'a pu être déterminé par suite de la présence de quantités importantes d'orthophosphate dans cette région du chromatogramme, cause probable d'une réaction positive douteuse avec le périodate. Pour la même raison les essais d'identification de l'acétyl-glucosamine, d'après la technique d'Aminoff et coll. (6) après hydrolyse des éluats et précipitation du nucléotide, n'ont pas abouti à des résultats significatifs. On doit sans doute d'autre part, attribuer à la présence du radical glucoaminé le fait que l'UDPAG présente des coordonnées chromatographiques différentes de celles de son homologue l'uridine diphosphate (UDP) (tache 12). Enfin, la concentration de l'UDPAG dans les extraits argentiques est environ moitié de celle des extraits plombiques.

Chromatographiés dans l'éthanol acétate pH 3,8 les éluats des *produits 11* et *12*, identifiés respectivement comme les uridine tri et diphosphate (UTP et UDP), donnent des taches dont le R adénosine respectif correspond aux di et monophosphates, chaque nucléotide ayant subi une hydrolyse partielle au cours de l'élution. La précipitation de UTP et UDP est plus complète par les sels de plomb et de mercure que par le

nitrate d'argent (60 p. 100 environ). Dans les 2 cas la précipitation par l'acétate de plomb, incomplète à pH 6,5 est achevée en milieu alcalin. La très faible concentration de la tache 11 (UTP) n'a pas permis la réaction au périodate ; appliquée au composé 12 (UDP), situé dans la zone du chromatogramme souillée d'orthophosphate, la même réaction est demeurée douteuse.

La concentration plus élevée du *produit 13* l'uridine 5' monophosphate (UM_5P) a permis de préciser quantitativement sa précipitation par les métaux lourds ainsi que l'indiquent les pourcentages suivants :

	acétate Pb	acétate Hg (CH_3COOH)	acétate Hg (NO_3H)	nitrate Hg	nitrate Ag
pH < 7	56	8	8	50	—
pH > 7	44	72	53	traces	67
Total	100	80	61	50	67

La réaction positive au périodate donnée par le composé 13 confirme qu'il s'agit d'un nucléoside 5' phosphate. En outre, ses caractéristiques chromatographiques dans l'éthanol acétate pH 3,8 sont celles de l'uridine 5' phosphate et sa position relative par rapport à son isomère l'acide uridylique dans le propanol ammoniacal confirme les valeurs de Rf indiquées par Baddiley et Mathias (11) pour le même solvant : UM_5P 0,23 — UM_3P 0,30.

Le *constituant n° 14* identifié à l'acide orotique, présente effectivement les caractéristiques spectrales de ce corps mais également celles des cytidine-phosphates. Aussi avons-nous pensé à l'origine qu'il s'agissait d'un composé analogue aux cytidine nucléosides isolés par Baddiley et Mathias (11) de *L. arabinosus*. Mais nous n'avons pas retrouvé les valeurs de Rf indiquées par ces auteurs dans l'isobutyrate d'ammonium et le propanol ammoniacal. Par ailleurs, l'hydrolyse formique de la tache 14 ne libère pas de cytosine et la réaction au périodate est négative. Par contre, en chromatographiant parallèlement dans le solvant *n.* propanol (60 v) eau (40 v) (155) de l'acide orotique marqueur et un éluat concentré du composé 14, nous avons trouvé des Rf identiques respectivement égaux à 0,54 et 0,52. En outre, l'acide orotique pur présente dans chacun des solvants que nous avons utilisés les mêmes caractéristiques chromatographiques que celle de la tache 14. Enfin, considéré comme dérivé nucléotidique de la cytosine, ce produit serait le seul dont le comportement chromatographique échapperait à la règle générale vérifiée dans tous les autres cas, si l'on tient compte de sa position par rapport à celles de l'acide cytidilique et des cytidine 5' mono et diphosphates.

La Figure 4 ci-dessous résume les conclusions précédentes en indiquant la position respective des divers nucléotides séparés par chromatographie bi-dimensionnelle sur papier et présents à l'état libre chez *S. cere-*

visiae. La photographie *a* (planche A) donne elle-même l'illustration des chromatogrammes obtenus dans ces conditions. On peut voir d'autre part sur la photographie *b* (planche A) l'image d'un autre chromatogramme bi-dimensionnel sur lequel a été effectuée la séparation des nucléosides 3' monophosphates de leurs isomères 5' monophosphates.

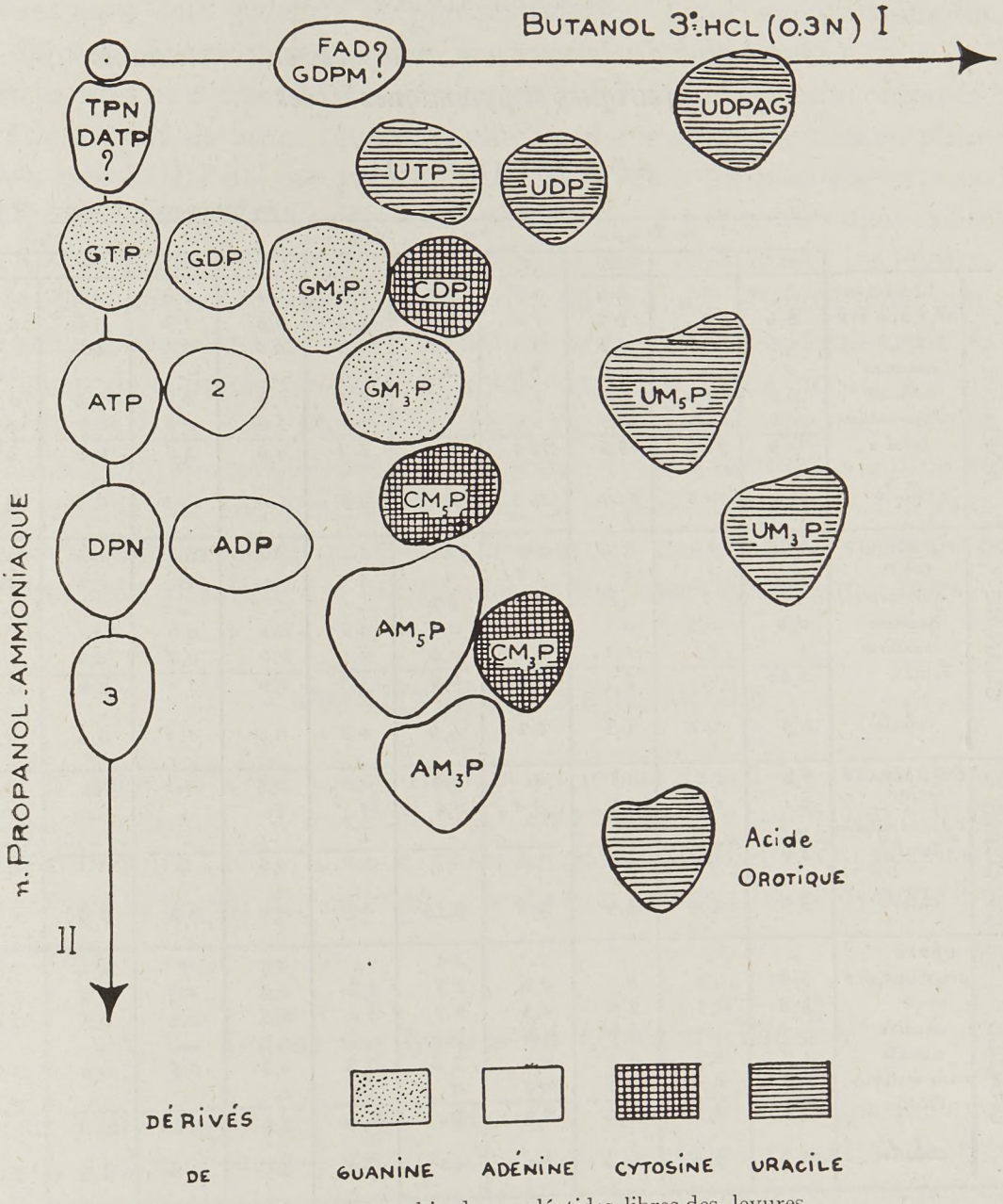


FIG. 4. — Chromatographie des nucléotides libres des levures.

2. — Etude quantitative.

La séparation et l'isolement par chromatographie des divers constituants puriques et pyrimidiques préexistant à l'état libre dans les cellules de levure, ont permis également leur étude quantitative. Nous avons rassemblé dans le tableau XV les résultats concernant la composition de diverses levures en composés puriques et pyrimidiques libres ; parallèle-

ment aux bilans qui ont pu être établis pour les dérivés d'une même base, nous avons fait figurer les concentrations correspondantes de la fraction acido-soluble calculées par différence entre les bases totales des levures et celles qui entrent dans la composition de la fraction nucléique. Dans

Tableau XV

Composition des levures non autolysées en constituants puriques et pyrimiques libres

µ M/gr levure (poids sec)

		S. cerevisiae Hansen						S. Carlsbergensis		S. oviform	S. Cerev. ellipsoideus
		Boulangerie			Brasserie		Distillerie	Cidre		Vin	
		12	13	15	11	10	9	3	7	4	6
ADÉNINE	DPN.TPN	3	2	2,4	0,5	1,8	1,2	0,6	0,8	1.	0,5
	AM_5P. ADP. ATP	8,6	9	8,2	1,6	8,1	2,2	1,3	1,2	1,2	0,6
	AM_3P	1,8	1,2	0,2	1	2,2	1,6	0,5	0,4	tr.	0,4
	adénosine	-	-	1,5	8,4	2,3	0,2	-	-	-	0,4
	adénine	0,9	0,6	0,7	c	3,4	0,5	0,6	0,4	1,4	0,5
	hypoxanthine	0,6	1,4	0,5	0,4	1,4	3.	1,6	0,7	0,9	tr
	Total :	14,9	14,2	13,5	12,7	19,2	8,7	4,6	3,5	4,5	2,4
	calculé	16,4	14,8	12,5	14,5	20	9,8	4,9	4,3	5,8	3,6
GUANINE	GM_5P GDP GTP	2,25	1,4	2,4	0,8	2	1,2	tr	0,5	0,3	0,3
	GM_3P	2.	1	1	1,1	1	1	tr	tr	0,2	tr.
	guanosine	-	-	-	1,2	0,2	-	-	-	-	-
	guanine	0,6	0,5	0,5	1	0,9	1,9	0,2	0,4	1.	0,2
	xanthine	1	1,5	1,1	1,4	0,6	1	0,6	0,5	0,6	0,2
	Total :	5,85	4,4	5	5,5	4,7	5,1	0,8	1,4	2,1	0,7
	calculé	6,9	4,6	4,5	6,2	4,4	6,3	1.	1,1	3,8	1,2
CYTOSINE	CM_5P. CDP. CTP	1,3	1,2	1,3	tr	0,9	0,3	0,5	tr.	tr.	tr.
	CM_3P	2,1	0,7	1,2	1,1	1,8	1	tr	-	-	0,3
	cytidine. cytosine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Total :	3,4	1,9	2,5	1,1	2,7	1,3	0,5	tr	tr	0,3
	calculé	3,9	2,4	3,4	2,9	3,25	1,6	1,1	0,4	0,9	0,5
URACILE	UDPAG	-	-	-	-	1,1	-	0,7	1	0,4	0,3
	UM_5P. UDP. UTP	6,1	4,2	5	1,2	2,3	1,2	0,9	0,7	0,9	0,5
	UM_3P	3,5	1,5	2,9	1,5	2,1	3.	0,5	0,8	0,5	0,6
	uridine	-	-	0,2	3,4	tr	-	-	-	-	
	uracile	1,1	2,9	1,3	1,4	2,5	2,2	0,3	0,5	0,6	0,2
	acide orotique	0,8	0,3	0,8	0,7	1	tr.	tr.	-	-	-
	Total :	11,5	8,9	10,2	8,2	9.	6,4	2,4	3.	2,4	1,6
	calculé	12,2	9,4	11,6	10	10	7,6	2	2,6	2,2	2,2

l'ensemble, le bilan moléculaire des constituants déterminés individuellement demeure inférieur aux concentrations calculées, montrant ainsi que certains composés à très faible concentration ont échappé à l'analyse.

Ces résultats précisent, en les confirmant, les observations qui ont pu déjà être faites lors de l'étude de la composition de la fraction acido-soluble des levures en purines et pyrimidines totales, aussi bien en ce qui concerne les proportions respectives des dérivés de l'adénine, de la gua-

nine, de la cytosine et de l'uracile que pour ce qui a trait à l'importance quantitative de ces divers constituants chez les levures examinées.

Toutes les levures renferment à l'état libre des concentrations variables de bases et de nucléosides. Le matériel nucléotidique est caractérisé par la présence simultanée des nucléosides 3' phosphates, et de leurs isomères en 5' aux 3 degrés de phosphorylation. Les concentrations les plus élevées se rencontrent chez *S. cerevisiae* Hansen alors que les autres levures ne contiennent bien souvent que des traces de tels composés.

Il convient de noter toutefois, en ce qui concerne les uridine phosphates, que l'UDPAG est présent chez les levures les plus pauvres en nucléotides dérivés de l'uridine mais paraît absent par contre chez celles qui en sont riches. Or, la première catégorie rassemble toutes les levures développées en anaérobiose et la seconde celles qui ont effectué leurs synthèses cellulaires dans un milieu fortement aéré. On notera également les différences de composition entre la levure 11, dont la dessiccation a été réalisée vers 35°C et les levures 12, 13 et 15, de même catégorie, qui ont été analysées après cryodessiccation. L'action de la chaleur dans le premier cas se traduit par une diminution importante des constituants nucléotidiques, particulièrement nette pour les dérivés de l'adénine, et par un accroissement parallèle des nucléosides et des bases correspondantes.

II. — CONSTITUANTS NUCLÉIQUES

Les acides nucléiques constituent la forme polymère du matériel purique et pyrimidique des cellules en même temps que la plus importante quantitativement. Nous allons exposer les résultats qui nous ont permis de déterminer la teneur des cellules de levure en acides ribo et désoxyribonucléiques.

A. — Teneur des levures en acides nucléiques.

Si la teneur des levures en ARN a été le plus souvent confondue avec celle en acides nucléiques totaux, c'est sans doute en raison de la très faible concentration des cellules en ADN, mais surtout parce que peu de méthodes offraient la possibilité d'un fractionnement cellulaire permettant de différencier les 2 types nucléiques. Et c'est précisément dans ce but que nous avons appliqué aux levures (28) le principe des méthodes proposées simultanément par SCHNEIDER (231) et par SCHMIDT et THANNHAUSER (228) pour les tissus animaux. Nous allons examiner la validité de chacune de ces méthodes dans la détermination quantitative de l'ARN des levures.

1. — Etude comparée des méthodes de SCHNEIDER et SCHMIDT-THANNHAUSER dans la détermination de l'ARN.

Une étude préliminaire effectuée sur diverses levures hautes pressées de boulangerie avait montré qu'à partir de la fraction nucléique insoluble d'une même levure, la concentration des constituants phosphorés libérés par extraction trichloracétique à chaud était de façon constante inférieure à la concentration en phosphore total des hydrolysats sodiques, même en augmentant le nombre d'extractions acides. C'est ainsi qu'un traitement par la soude 1N à 37°C pendant 18 heures extrait 47,9 p. 100 du P total tandis qu'après 4 extractions trichloracétiques de 15 minutes à 90°C 43,1 p. 100 du P total sont libérés et 45,1 p. 100 après 8 extractions.

Tout se passe comme si, dans la technique de SCHNEIDER, une fraction phosphorée se trouvait liée plus fortement aux protéines et résisterait au traitement acide. Des essais ultérieurs, utilisant indifféremment l'acide trichloracétique ou l'acide perchlorique et appliqués à une plus grande variété de levures, ont confirmé les observations antérieures, bien qu'il nous ait été donné de constater que l'acide perchlorique solubilisait des quantités de phosphore total plus élevées que l'acide trichloracétique.

Mais nous avons eu déjà l'occasion de souligner que le phosphore constituait l'élément le moins spécifique dans la détermination des acides nucléiques. En effet, dans le cas particulier des levures, les acides trichloracétique ou perchlorique extraient à chaud, outre l'ARN et l'ADN, le métaphosphate « insoluble » à froid éventuellement présent dans les cellules, ce dernier pouvant être également extrait à température plus basse en milieu alcalin avec les 2 acides nucléiques et l'orthophosphate d'origine protéique.

C'est pour cette raison que le dosage du phosphore total extrait dans l'un et l'autre cas a été complété par des déterminations spectrophotométriques plus spécifiques. Celles-ci ont été effectuées, d'une part

Levures	S. cerevisiae Hansen				T. utilis		S. carlsb.	S. cer. ellips	
	Boulangerie			Brass.	Distillerie		Cidre	Vin	
	12	13	15	10	9	8	7	2	5
	P. extrait p 100 du P total								
Méthodes :									
Schneider....	41,3	56,5	46,7	25,5	—	57,2	44	62,7	45
Schmidt Th .	44,6	58,1	50,7	26,9	61,7	62,2	50,3	66	48,6
	ARN p 100 (poids sec)								
Schneider ...	3,89	3,85	4,80	5,40	6,53	3,31	3,60	7,73	4,06
Schmidt Th.	5,04	5,06	6,10	6,46	7,05	3,90	6,33	9,21	6,34

sur la fraction ribonucléique des hydrolysats sodiques après précipitation de l'ADN, d'autre part sur les extraits trichloracétiques ou perchloriques obtenus à chaud et contenant la somme (ARN + ADN). Nous indiquons ci-dessus les résultats obtenus sur diverses levures et concernant à la fois le phosphore total extrait et l'acide nucléique dosé exprimé en ARN.

Ces résultats mettent en évidence que l'hydrolyse alcaline de la fraction nucléique des levures selon SCHMIDT-THANNHAUSER libère dans tous les cas davantage de phosphore total que l'extraction acide selon SCHNEIDER. De plus, les concentrations en ARN obtenues dans le premier cas et déterminées par l'absorption ultraviolette, sont de manière constante supérieures à celles fournies par les extraits trichloracétiques ou perchloriques, même en négligeant leur teneur en ADN.

On pourra objecter que l'hydrolyse alcaline, en même temps qu'elle libère les acides nucléiques, dégrade partiellement le matériel protéique des cellules et que les peptides de faible poids moléculaire ainsi libérés, échappant à la précipitation acide à froid, sont responsables de la différence observée du fait que leur maximum d'absorption se situe lui-même dans la région de 270-280 mμ. Mais l'absorption ultraviolette des acides nucléiques est de 40 à 60 fois supérieure à celle des protéines ; il n'est donc guère possible d'envisager que ces dernières éventuellement dégradées soient responsables des différences observées, les concentrations en ARN ainsi déterminées pouvant dans certains cas être supérieures de 56 (lev. 5) et même 76 p. 100 (lev. 7) à celles obtenues à partir des extraits acides. De toute façon, les erreurs par excès éventuellement commises ne peuvent être de cet ordre.

Il semble donc rationnel de conclure que la méthode de SCHNEIDER appliquée aux levures ne permet pas une détermination quantitative de l'ARN.

2. — Détermination de l'ARN et de l'ADN.

La méthode de SCHMIDT-THANNHAUSER, en réalisant la séparation de l'ARN et de l'ADN, permet d'effectuer respectivement sur chaque fraction des déterminations parallèles faisant appel à la nature des constituants biochimiques (phosphore et pentoses) ou aux propriétés d'absorption ultraviolette des 2 acides nucléiques. C'est en appliquant à chacune des fractions nucléiques ainsi obtenues les techniques analytiques décrites par ailleurs qu'il nous a été possible de déterminer les teneurs en ARN et ADN d'une série de levures. Les résultats qui ont été obtenus par dosage du phosphore, du ribose et du désoxyribose ou par mesures spectrophotométriques sont consignés dans le tableau XVI suivant.

Ces résultats appellent diverses observations tant en ce qui concerne les teneurs en ARN que celles en ADN.

a) Teneurs en ARN

La détermination quantitative de l'ARN par l'intermédiaire du ribose a, dans tous les cas, conduit à des teneurs anormalement élevées. Nous avons indiqué précédemment que les intensités de coloration obtenues par réaction à l'orcine étaient rapportées à une courbe étalon établie à partir d'un échantillon d'ARN de rapport purines/pyrimidines = 1,40. Or, nous aurons l'occasion de montrer ultérieurement que la valeur

Tableau XVI

Détermination de la teneur des levures en ARN et ADN

		S. cerevisiae Hansen					T. utilis	S. carlsbergensis		S. cerev. var ellipsoïdeus		
		Boulangerie			Brasserie	Distillerie		Cidre		Vin		
		1	11	15	10	9	8	3	7	2	5	6
Ptotal (mg p 100 g lev. ss)		1750	981	1320	2402	1180	688	1902	1778	1535	1514	1254
		p 100 de levure (pds sec)										
ARN	par Ribose	10,40	4,66	6,71	6,46	7,34	4,89	5,62	6,36	8,25	6,92	5,87
	par Phosphore	9,37	5	6,63	6,49	7,31	4,19	7,28	8,50	10,10	7,28	7,13
	par Spectroph.	9,41	4,42	6,10	6,46	7,05	3,90	5,30	6,33	9,21	6,34	5,65
ADN	par Désoxyribose	0,140	0,185	0,175	0,141	0,175	0,112	0,297	-	0,297	0,255	0,210
	par Phosphore	0,247	0,287	0,318	0,232	0,260	0,250	0,648	0,798	0,388	0,358	0,490
	par Spectroph.	0,170	0,220	0,295	0,173	0,190	0,183	0,320	0,370	0,328	0,370	0,322
	ARN	9,41	4,42	6,10	6,46	7,05	3,90	5,30	6,33	9,21	6,34	5,65
	ADN	0,170	0,220	0,295	0,173	0,190	0,183	0,320	0,370	0,328	0,364	0,372
	A.R.N/A.D.N.	55,3	20	20,6	37,3	37,1	21,3	16,5	17,1	28	17,4	17,5
		p 100 du Ptotal										
P Ribonucléique		51,60	43,30	44,40	25,80	57,30	54,40	26,8	34,10	57,60	40,20	43,20
P. Poly. "insoluble"		0	5,90	3,90	0,16	2,20	4,15	10.	11,70	5,90	6.	11,40
P désoxy. Ribonucl.		0,97	2,24	2,23	0,72	1,61	2,66	1,68	2,08	2,13	2,40	2,56
P indéterminé		0,44	0,68	0,17	0,23	0,59	0,97	1,72	2,40	0,39	0	1,34

moyenne de ce rapport établie pour l'ARN cellulaire non isolé est de 1,22. Puisque la réaction de Bial ne concerne que les groupements puriques de l'ARN, il a donc été nécessaire d'appliquer aux résultats analytiques faisant intervenir le dosage du ribose un coefficient de correction tenant compte de la valeur des rapports purines/pyrimidines respectifs de l'ARN cellulaire non isolé et de l'ARN ayant servi à l'étalonnage. Ce coefficient, qui a pour valeur le rapport $\frac{1,40}{1,22} = 0,87$, appliqué aux teneurs en ARN obtenues par dosage du ribose, conduit aux teneurs rectifiées figurant sur le tableau XVI précédent.

Comparées aux teneurs fournies par le dosage du phosphore, on peut observer que, s'il y a une assez bonne concordance dans certains cas (levures de boulangerie, de brasserie et de distillerie), il en est d'autres où ces teneurs sont notablement plus faibles (levures de cidre et de vin). En outre, les valeurs obtenues par spectrophotométrie sont, à une excep-

tion près (levure 1), inférieures à celles déterminées par le phosphore, la différence étant particulièrement marquée dans le cas de *S. carlsbergensis* et *S. cerev. ellipsoideus*.

Il faut donc admettre qu'une partie du phosphore dosé, variable selon les levures, n'est pas de nature ribonucléique et que seules les teneurs déterminées par spectrophotométrie expriment la concentration maxima des cellules en ARN, si l'on veut tenir compte des erreurs par excès éventuellement causées par les produits de dégradation des protéines. Dans un certain nombre de cas celles-ci sont en bon accord avec les valeurs fournies par le ribose mais cette corrélation est loin d'être systématique.

b) Teneurs en ADN

La détermination de l'ADN par le désoxyribose conduit à des teneurs régulièrement plus faibles que celles fournies par le phosphore ou l'absorption ultraviolette, les teneurs étant dans ce dernier cas elles-mêmes inférieures à celles dérivant du phosphore. Si la détermination spectrophotométrique de l'ADN ne peut être considérée comme plus spécifique que la réaction de Dische, elle est du moins beaucoup plus sensible. Aussi, étant données les très faibles quantités dosées, doit-on davantage tenir compte des valeurs spectrophotométriques que de celles obtenues par l'intermédiaire du désoxyribose, l'une et l'autre étant d'ailleurs assez proches dans certains cas. Quant aux valeurs élevées fournies par le phosphore, elles ne peuvent s'expliquer que par la présence aux côtés de l'ADN d'un constituant cellulaire phosphoré de nature non nucléique.

En définitive, tant en ce qui concerne l'ARN que l'ADN, seules doivent être considérées comme valables les teneurs établies à partir des caractéristiques physiques d'absorption ultraviolette des 2 types d'acides nucléiques. Ce sont ces teneurs qui ont été rapportées sur le tableau XVI et c'est à partir d'elles qu'ont été établis les rapports ARN/ADN correspondants.

La teneur des levures en acides nucléiques se révèle comme extrêmement variable puisqu'elle est comprise entre 3,90 et 9,41 pour l'ARN, entre 0,170 et 0,372 pour l'ADN. Les concentrations les plus élevées en ARN se rencontrent chez les levures 1 et 2 qui sont des cultures pures ; les levures du groupe *S. Cerevisiae* Hansen et *T. utilis* présentent des teneurs faibles en ADN (de 0,170 à 0,295) alors que *S. carlsbergensis* et *S. cerevisiae ellipsoideus* sont manifestement plus riches en ce constituant avec des teneurs comprises entre 0,320 et 0,372.

Les rapports ARN/ADN traduisent eux-mêmes cette variabilité dans la composition nucléique des cellules puisqu'ils sont compris entre 16,5 et 55,3, les valeurs les plus faibles revenant aux levures de vin et de cidre, exception faite de la levure 2. Par sa teneur élevée en ARN et sa

teneur faible en ADN la levure 1 constitue un cas extrême ; mais il n'apparaît pas de relation systématique entre la composition nucléique des cellules et leurs conditions de culture. On peut seulement observer que les concentrations les plus élevées en ARN se rencontrent chez les levures riches en azote total ; par contre une teneur élevée en phosphore ne s'accompagne pas obligatoirement d'une forte concentration en ARN.

Il ressort des résultats exposés que la détermination des acides nucléiques des levures pas l'intermédiaire du phosphore constitue une méthode non spécifique si l'on ne tient pas compte des constituants cellulaires phosphorés de nature non nucléique. Aussi allons-nous maintenant aborder l'étude des phosphoprotéines et des polyphosphates constituant la fraction non nucléique du matériel cellulaire insoluble présente aux côtés de l'ARN et de l'ADN.

3. — Les phosphoprotéines des levures.

Selon SCHNEIDER, les phosphoprotéines des tissus animaux ne sont pas extraites à chaud par l'acide trichloracétique. Dans la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER, au contraire, l'hydrolyse alcaline aurait pour effet, tout en scindant l'ARN en mononucléotides, de libérer le phosphore lié aux protéines à l'état d'orthophosphate.

L'application de ces 2 méthodes à diverses levures de boulangerie et de brasserie ne nous a pas permis de mettre en évidence l'existence d'une telle fraction.

En soumettant à l'hydrolyse alcaline le résidu cellulaire obtenu dans la technique de SCHNEIDER après extraction des acides nucléiques, la précipitation par le réactif citro-magnésien de l'ortho-phosphate éventuellement libéré dans ces conditions n'a conduit à aucun résultat positif. Nous n'avons pas réussi davantage à caractériser l'ortho-phosphate dans les hydrolysats sodiques de la fraction nucléique obtenue selon SCHMIDT et THANNHAUSER, pas plus que dans la fraction ribonucléique de ces hydrolysats obtenue aussitôt après précipitation de l'ADN. Nous avons seulement observé que cette fraction trichloracétique-chlorhydrique, soigneusement conservée au froid, libérait en fonction du temps des quantités d'ortho-phosphate d'autant plus importantes que le séjour au froid était prolongé, témoignant d'une hydrolyse lente des ribomononucléotides.

Les observations précédentes se sont trouvées confirmées dans une autre série d'essais où il a été fait appel à l'action spécifique d'une protéase. Les fractions cellulaires « insolubles » de différentes levures ont été soumises à l'action de la trypsine à pH 8,7 et à 37°C. Compte tenu de l'activité ribonucléasique de la trypsine utilisée, nous n'avons constaté dans nos conditions expérimentales aucune libération d'ortho-phophate.

Nous avons enfin isolé d'une levure de boulangerie et d'une levure de brasserie, dans les conditions décrites par THOMAS (252), des préparations protéiques analogues à la zymocaséine identifiée par l'auteur. Ces préparations ont été analysées quant à la teneur en N total et P total et l'une d'elles soumise à l'hydrolyse chlorhydrique dans les mêmes conditions que pour l'ARN. L'analyse chromatographique de l'hydrolysat a mis en évidence la présence des 2 bases puriques et des 2 nucléotides pyrimidiques constituants de l'ARN. Voici les résultats obtenus :

	(p 100 du poids sec)	
	N. total	P. total
	—	—
zymocaséine levure boulangerie.....	13,27	0,273
— brasserie.....	14,22	0,257

	μ M/gr. (poids sec)				
	guanine	adénine	ac. cytidyl.	ac. uridyl.	$\frac{\text{purines}}{\text{pyrimidines}}$
	—	—	—	—	—
zymocaseine levure boulangerie....	28	22,7	20,3	25,5	1,10

Les teneurs respectives en azote total des préparations mettent en évidence leur nature protéique ; toutefois leur teneur en phosphore total est considérablement plus faible que celle rapportée par THOMAS pour ses préparations de zymocaséine. D'autre part, la nature des constituants puriques et pyrimidiques libérés par hydrolyse ainsi que leurs proportions moléculaires respectives, ne permettent guère de douter de l'origine nucléique du phosphore présent dans le matériel protéique isolé.

A la lumière de ces divers résultats, il n'apparaît pas que l'excès de phosphore observé lors de la détermination quantitative de l'ARN chez les levures puisse être d'origine protéique.

4. — **Les polyphosphates « insolubles » des levures.**

Les extraits perchloriques ou trichloracétiques obtenus selon SCHNEIDER contiennent une certaine quantité d'ortho-phosphate résultant à la fois d'une dégradation partielle de l'ARN et d'une hydrolyse des méta et polyphosphates éventuellement présents. Nous avons vérifié qu'après un contact d'une heure à 90°C dans l'acide trichloracétique 5 p. 100, 12 p. 100 du phosphore de l'ARN sont libérés à l'état d'ortho-phosphate et que le métaphosphate est hydrolysé lui-même quantitativement en ortho-phosphate. On sait d'autre part que dans les mêmes conditions, une fraction importante des polyphosphates est dégradée en ortho-phosphate (53).

L'hydrolyse chlorhydrique ménagée des mêmes extraits (7 minutes à 100°C en milieu 1N) met en évidence qu'une certaine fraction du matériel phosphoré des cellules, variable selon les levures, est libérée à l'état

d'orthophosphate. Il n'est cependant pas possible de déterminer ainsi les polyphosphates éventuellement présents puisque, dans les mêmes conditions d'hydrolyse, l'ARN subit lui-même une nouvelle dégradation.

En tenant compte des teneurs en ARN obtenues par spectrophotométrie et de la teneur en phosphore des fractions ribonucléiques correspondantes on a pu toutefois, en utilisant la technique d'hydrolyse alcaline de SCHMIDT-THANNHAUSER, évaluer la teneur en polyphosphates insolubles des diverses levures examinées.

Les concentrations en ARN déterminées par spectrophotométrie sont estimées en phosphore ribonucléique, en se basant sur la teneur théorique de l'ARN en phosphore (231) ; par différence entre le phosphore effectivement dosé et le phosphore ribonucléique calculé, on obtient ainsi le phosphore des polyphosphates. Si une telle méthode ne présente pas le caractère de spécificité de celle préconisée par WIAME (274), elle permet au moins une évaluation des polyphosphates cellulaires. L'absence de phosphore d'origine protéique autorise donc à considérer l'excès de phosphore mis en évidence dans la détermination de l'ARN comme étant de nature inorganique. Nous avons rapporté parallèlement sur le tableau XVI les teneurs respectives des levures étudiées en P ribonucléique et en P des polyphosphates « insolubles », exprimées en p. 100 du phosphore total cellulaire.

On peut observer que chez *S. cerevisiae* Hansen et *T. utilis* la teneur en polyphosphates est peu importante (de 0,16 à 5,9 p. 100 du P total) et même nulle dans le cas de la levure 1, ceci impliquant que la presque totalité du phosphore dosé est d'origine ribonucléique. Au contraire chez *S. carlsbergensis* et *S. cerevisiae ellipsoideus*, les polyphosphates représentent une fraction plus importante du phosphore total cellulaire comprise entre 5,8 et 11,7.

Nous avons vu précédemment, lors de la détermination de l'ADN, que les mesures spectrophotométriques conduisent à des valeurs plus faibles que celles obtenues par dosage du phosphore total de la fraction ADN-protéines. On peut, dans les mêmes conditions que pour l'ARN, calculer les proportions respectives de phosphore désoxyribonucléique et du matériel phosphoré inconnu accompagnant l'ADN. L'importance quantitative de ces 2 fractions, exprimée en p. 100 du phosphore total, est indiquée dans le tableau XVI pour chaque levure. La nature de cette fraction phosphorée non nucléique n'a pu être précisée. Elle représente une proportion très faible du phosphore total chez *S. cerevisiae* et *T. utilis* (0,17 à 0,97), plus importante chez les autres levures, atteignant 2,4 chez la levure 7. Quant au phosphore désoxynucléique, il constitue lui-même une fraction très variable en même temps qu'assez faible du phosphore cellulaire (de 0,72 à 2,66 p. 100).

B. — Composition nucléotidique de l'ARN.

1. — Influence des méthodes d'isolement et de purification.

On a vu antérieurement que la composition nucléotidique de l'ARN de levure isolé et purifié par des méthodes très diverses présente des variations importantes d'une préparation à l'autre (tableau III).

Nous avons voulu vérifier en quel sens les méthodes d'isolement et de purification étaient susceptibles d'intervenir dans ces variations. A cet effet, nous avons déterminé la composition en nucléotides de la fraction cellulaire délipidée acido-insoluble d'une levure, contenant la totalité de ses constituants nucléiques ; les mêmes déterminations ont été faites sur 2 préparations brutes d'ARN obtenues à partir de la même levure par les techniques d'isolement faisant intervenir l'extraction par la soude à froid ou par le chlorure de sodium à chaud. Ces préparations convenablement purifiées par déprotéinisation ont été analysées de la même façon ainsi qu'un échantillon commercial d'ARN soumis à un traitement identique. Les résultats obtenus ont été groupés dans le tableau XVII suivant, sur lequel figurent également les teneurs en azote et phosphore des divers échantillons examinés.

Tableau XVII

Influence des méthodes d'isolement et de purification sur la composition de l'ARN de levure

	Fraction nucléique levure 14	Préparations ribonucléiques isolées de levure 14 — Brutes — extraction NaCl	Brutes — extraction NaOH	« Purifiées » — NaCl	« Purifiées » — NaOH	Échantillon d'ARN commercial — Brut	Échantillon d'ARN commercial — « Purifié »
N %	—	8,30	11,20	11,70	12,80	15.55	15,65
P %	—	6,03	6,15	6,73	7,27	8,95	9
N/P	—	1,37	1,82	1,73	1,76	1,73	1,74
	µM/gr levure (ss)	µM p 100 mg ARN sec					
GUANINE	32,8	31	48,7	49,2	58,1	77,4	79,6
ADÉNINE	30,6	29	44,3	43,2	51,8	70	65,7
CYTOSINE	21,6	21,9	34,2	34,2	37,3	52,3	49,5
URACILE	29,9	29,2	38,2	41,4	42,6	62,1	54
		= . Rapports moléculaires .					
GUANINE / ADÉNINE	1,07	1,07	1,10	1,13	1,12	1,10	1,21
URACILE / CYTOSINE	1,33	1,33	1,11	1,21	1,13	1,18	1,09
PURINES / PYRIMIDINES	1,23	1,17	1,28	1,22	1,37	1,28	1,40

Si on compare la composition en nucléotides de la fraction nucléique et celle des 2 préparations ARN-NaCl et ARN-NaOH isolées telles quelles sans purification préalable, on constate que les rapports moléculaires guanine/adénine et uracile/cytosine de ARN-NaCl sont les mêmes que ceux de la fraction nucléique, tandis que les mêmes rapports pour ARN-NaOH sont différents ; en outre le rapport purines/pyrimidines présente lui-même des valeurs non identiques. Puisque les déterminations concernant la fraction nucléique de la levure ont été faites sans isolement préalable de l'ARN, on peut admettre que sa composition nucléotidique traduit aussi fidèlement que possible celle du matériel ribonucléique intracellulaire. On constate alors que l'extraction par le chlorure de sodium fournit un ARN de composition très voisine de celle de l'ARN cellulaire, dont le taux en constituants puriques demeure toutefois légèrement inférieur ; au contraire, la méthode utilisant la soude comme agent d'extraction conduit à une préparation de composition différente caractérisée par une perte de constituants pyrimidiques et plus particulièrement d'acide uridylique.

La purification, qui consiste à éliminer la quasi totalité du matériel protéique, se traduit évidemment par un accroissement de la concentration en nucléotides, accroissement d'ailleurs beaucoup plus marqué dans la préparation ARN-NaCl. En examinant les rapports moléculaires des nucléotides dans les nouvelles préparations obtenues, on constate dans les 2 cas, et particulièrement pour ARN-NaOH, un accroissement du rapport purines/pyrimidines témoignant d'une perte en constituants pyrimidiques. Cette perte semble affecter à la fois les acides cytidylique et uridylique pour ARN-NaOH, le rapport uracile/cytosine demeurant pratiquement inchangé, et plus particulièrement l'acide uridylique pour ARN-NaCl, le rapport uracile/cytosine passant de 1,33 à 1,21.

Cette élimination de certains groupements de nature pyrimidique de l'ARN par « purification » des préparations, est également mise en évidence dans le cas de l'échantillon commercial d'ARN dont les teneurs en N et P ainsi que la concentration en nucléotides démontrent qu'il s'agit d'une préparation ayant déjà subi une déprotéinisation poussée. Le traitement au chloroforme apporte encore des modifications profondes : les taux en acides adénylique et cytidylique accusent une baisse sensible, mais c'est principalement l'acide uridylique qui est affecté. La perte en constituants pyrimidiques sous l'influence des agents de déprotéinisation se réflète dans la valeur du rapport purines/pyrimidines qui passe de 1,28 à 1,40 alors que le rapport uracile/cytosine passant de 1,18 à 1,09 montre la perte en acide uridylique.

2. — Composition de l'ARN non isolé chez diverses levures.

Les résultats précédents mettent donc bien en évidence que la composition nucléotidique de l'ARN cellulaire peut être plus ou moins profondément modifiée au cours de l'isolement et de la purification. En conséquence l'analyse directe de la fraction cellulaire insoluble sans isolement préalable de l'ARN a été appliquée à une série de levures de genre, d'espèce et de variétés différentes, cultivées dans des conditions et à partir de milieux également différents. Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le tableau XVIII.

TABLEAU XVIII

Composition de la fraction ribonucléique de diverses levures

	S. cerevisiae Hansen						T. utilis	S. carev. var. ellipsoideus			S. oviform.	S. carlsb.
	Boulangerie				Brasserie	Distillerie		Vin				Cidre
	1	17	13	14	10	9	8	2	5	6	4	7
	µM/100 gr levure (poids sec)											
GUANINE	6.970	4.220	3.510	3.280	4.670	4.900	2.830	6.400	3.250	3.320	3.440	2.720
ADÉNINE	6.800	4.100	3.420	3.060	4.500	4.420	2.680	6.400	3.750	3.570	3.520	3.070
CYTOSINE	4.810	2.980	2.430	2.160	3.300	3.240	2.020	4.510	2.200	2.590	2.480	1.960
URACILE	6.350	3.690	3.240	2.990	4.030	4.150	2.580	5770	2.810	3.130	3.230	2.480
PURINES	13.770	8.320	6.930	6.340	9.170	9.320	5.510	12.800	7.000	6.890	6.960	5.790
PYRIMIDINES	11.160	6.670	5.670	5.150	7.330	7.390	4.600	10.280	5.010	5.720	5.710	4.440
	RAPPORTS MOLÉCULAIRES											
GUANINE / ADÉNINE	1,02	1,03	1,02	1,07	1,04	1,10	1,05	1	0,87	0,93	0,97	0,89
URACILE / CYTOSINE	1,32	1,24	1,33	1,33	1,22	1,28	1,22	1,27	1,27	1,20	1,30	1,26
PURINES / PYRIMIDINES	1,23	1,24	1,22	1,23	1,25	1,26	1,20	1,24	1,38	1,20	1,22	1,30
	RAPPORTS MOLÉCULAIRES (Total = 4)											
GUANINE	1,11	1,13	1,11	1,14	1,13	1,16	1,12	1,11	1,08	1,05	1,09	1,06
ADÉNINE	1,09	1,09	1,09	1,07	1,09	1,06	1,06	1,11	1,25	1,12	1,11	1,20
CYTOSINE	0,77	0,81	0,78	0,76	0,80	0,78	0,80	0,79	0,74	0,83	0,79	0,77
URACILE	1,02	0,98	1,03	1,04	0,98	1	1,03	1	0,94	1	1,02	0,97

Ainsi que nous avions pu le constater à partir des résultats concernant les purines et pyrimidines totales des levures, les teneurs des cellules en nucléotides puriques et pyrimidiques d'origine ribonucléique apparaissent comme extrêmement variables. En ce qui concerne les purines, les teneurs sont comprises entre 5 510 (lev. 8) et 13 770 (lev. 1) µM par 100 g de poids sec et pour les pyrimidines entre 4 440 (lev. 7) et 11 160 µM (lev. 1). Il semble, sans qu'il existe toutefois de relation systématique, que les levures les plus riches en nucléotides ribonucléiques soient également celles dont la teneur en azote total est la plus élevée ; c'est du moins le

cas des levures 1, 2 et 10 qui contiennent respectivement 10,45 -9,20 et 8,40 p. 100 d'azote total ; inversement la levure la plus pauvre en constituants ribonucléiques est également celle dont le taux d'azote est le plus faible (5,62 p. 100). Il y aurait là un indice de l'interdépendance des synthèses cellulaires protéiques et ribonucléiques.

Les rapports moléculaires calculés à partir des concentrations en nucléotides de chaque levure ne reflètent plus les différences précédentes, mais font apparaître au contraire que les porportions moléculaires des nucléotides de l'ARN varient dans des limites très étroites. Exception faite des levures 5 et 7 dont l'ARN présente un rapport purines/pyrimidines plus élevé, pour toutes les levures examinées, ce rapport oscille entre 1,20 et 1,26. Le rapport uracile/cytosine qui accuse des variations plus sensibles est compris entre les valeurs extrêmes de 1,20 et 1,33. Quant au rapport guanine/adénine, on constate qu'il peut être, selon les souches examinées, supérieur ou inférieur à l'unité. Toutes les levures du groupe de *S. cerevisiae* Hansen ainsi que *T. utilis* se caractérisent en effet par un rapport guanine/adénine compris entre 1,02 et 1,10. Au contraire, chez *S. cerev.* var. *ellipsoideus*, *S. oviformis* et *S. carlsbergensis*, ce même rapport a pour limites extrêmes 0,87 et 1.

Les similitudes ou les différences précédentes sont une nouvelle fois mises en évidence en rapportant les concentrations de chaque nucléotide à un total théorique de 4 molécules. Dans le cas des levures du groupe *S. cereviae* Hansen, pour 4 molécules de bases puriques et pyrimidiques entrant dans la constitution de l'ARN, il y aurait de 1,11 à 1,16 molécule de guanine, de 1,06 à 1,09 molécule d'adénine, la cytosine comptant pour 0,76 à 0,81 molécule et l'uracile pour 0,98 à 1,04. Pour le second groupe de levures, les porportions moléculaires de l'uracile (0,94 à 1,02) et de la cytosine (0,74 à 0,83) sont sensiblement identiques, mais on compte pour la guanine de 1,05 à 1,11 molécule alors que l'adénine prédomine à raison de 1,11 à 1,25 molécule.

Il convient d'ajouter que chacune des valeurs figurant sur le tableau XVIII représente la moyenne de 3 et dans certains cas 4 déterminations distinctes concernant à la fois les hydrolysats chlorhydriques des fractions nucléiques et la séparation chromatographique des produits d'hydrolyse, les erreurs réalisées entre les divers essais ne dépassant pas 5 p. 100.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

LES CONSTITUANTS PURIQUES ET PYRIMIDIQUES DES LEVURES

1. — CONSTITUANTS CELLULAIRES ACIDO-SOLUBLES

La détermination quantitative des purines et pyrimidines totales des levures fait ressortir l'avantage des méthodes d'analyses physico-chimiques pratiquées actuellement sur les méthodes plus anciennes exclusivement chimiques. Si les résultats concernant les purines que nous avons obtenus par l'emploi conjugué de la chromatographie et de la spectrophotométrie sont en bon accord avec les résultats antérieurs de Dirr et Decker (79), ils rendent également compte de l'importance quantitative de l'azote pyrimidique, dont les méthodes chimiques n'ont pas permis la détermination.

Mais l'avantage des méthodes physico-chimiques pratiquées dans ce travail est plus particulièrement mis en évidence dans l'étude des constituants puriques et pyrimidiques libres des cellules. Nous avons indiqué antérieurement que l'emploi de la chromatographie d'échange d'ions a permis tout récemment à Cabib et coll. en 1953 (37) et à Schmidt en 1954 (229) de caractériser une grande variété de constituants nucléotidiques puriques et pyrimidiques présents à l'état libre dans les cellules de levure.

La méthode de chromatographie bi-dimensionnelle sur papier que nous avons pratiquée permet avec un outillage simplifié, non seulement la séparation individuelle de la plupart des nucléotides identifiés par les précédents auteurs mais encore leur détermination quantitative. Elle précise en même temps la composition des cellules en nucléosides et bases puriques et pyrimidiques libres.

Nous avons vu, exception faite d'un composé non identifié, que la séparation chromatographique et la caractérisation des bases et des nucléosides n'a pas présenté de difficultés particulières. L'emploi en première dimension du *n*-butanol ammoniacal déplaçant tous les composés à l'exception des nucléotides y a bien entendu largement contribué. Si d'autre part, l'identification de certains nucléotides s'est révélée plus laborieuse, la détermination de certaines de leurs caractéristiques physiques et chimiques a permis d'établir l'identité de 10 d'entre eux.

En définitive, c'est un total d'au moins 21 nucléotides différents, exception faite de l'acide orotique, qui composent le matériel purique et pyrimidique acido-soluble des cellules de levure. Et si leur séparation

individuelle par chromatographie bidimensionnelle sur papier a pu être, pour le plus grand nombre, menée à bien, c'est en raison des propriétés particulières présentées par les solvants choisis. On a vu en effet que les Rf élevés des composés pyrimidiques dans le solvant acide permettaient leur séparation satisfaisante des composés puriques, la séparation des acides adénylique et cytidylique demeurant toutefois assez délicate ; on a signalé également la possibilité offerte par le solvant alcalin d'éliminer totalement les nucléosides et les bases par écoulement prolongé pour ne conserver que les nucléotides ; on connaît enfin cette caractéristique fondamentale des 2 solvants, de séparer les nucléotides en fonction de leur degré de phosphorylation et de la position de la liaison phosphoester sur le ribose.

Mais en regard de ses incontestables avantages, la méthode chromatographique utilisée, qui ne prétend pas à la perfection, présente aussi un certain nombre d'inconvénients résultant presque essentiellement des propriétés basiques du solvant de 2e dimension. Si en effet le solvant acide, par suite de la durée d'écoulement, risque de provoquer une déphosphorylation partielle portant plus particulièrement sur les triphosphates, le solvant alcalin présente les risques d'une hydrolyse plus poussée, pouvant aller jusqu'au stade monophosphate.

Si des composés tels que l'ATP et le DPN sont suffisamment stables en milieu acide, en milieu alcalin ils sont transformés plus ou moins rapidement selon le degré d'alcalinité, le premier en AM_5P, le second en AM_5P + nicotinamide, l'adénosine monophosphate étant stable dans ces conditions. C'est pour cette raison que les déterminations quantitatives du DPN n'ont pas été effectuées sur la tache correspondante obtenue en chromatographie bidimensionnelle, mais après séparation unidimensionnelle dans le butanol 3° 0,8 N en HCl, le DPN étant dans ces conditions nettement séparé des autres composés. Pour la même raison, les concentrations en AM_5P déterminées après chromatographie bidimensionnelle sont de beaucoup supérieures aux concentrations respectives de l'ATP et de l'ADP. Il n'en reste pas moins que la somme (AM_5P + ADP + ATP), déterminée dans nos conditions expérimentales sur les extraits de levures de boulangerie ou de brasserie, correspond aux concentrations en ATP obtenues sur des levures identiques par Steyn-Parve (241) par une méthode enzymatique.

L'alcalinité du solvant de 2e dimension affecte dans le même sens les dérivés tri et diphosphates de la guanosine, de la cytidine et de l'uridine puisque les dérivés monophosphates correspondants manifestent les concentrations les plus élevées ; c'est pour cette raison que les teneurs rapportées dans le tableau XV concernent les 3 degrés de phosphorylation d'un même nucléotide. D'un même point de vue, les dérivés glucose et galactose de l'uridine 5' pyrophosphate isolés par Leloir et coll. (39-40-154) des cellules de levure (UDPG et UDPGa) et le dérivé glucuronique

correspondant identifié par SCHMITZ (229) (UDPGl) ont été hydrolysés en UM_5P, ce qui explique qu'il n'aient pas été mis en évidence. Par contre, l'uridine diphosphate-acétyl-glucosamine (UDPAG), stable en milieu alcalin, n'a pas subi cette action hydrolytique du solvant ammoniacal.

Enfin si la méthode de chromatographie de partage sur papier présente sur la chromatographie d'échange d'ions l'avantage de la simplicité, elle ne permet par contre d'isoler que des quantités infimes de produits, rendant extrêmement difficile leur analyse ultérieure lorsqu'il s'agit de composés inconnus.

En définitive, nos résultats apportent des précisions quantitatives sur les nucléotides présents à l'état libre dans la fraction acido-soluble des cellules de levure. Ces nucléotides sont de 2 sortes :

— d'une part des nucléosides 3' phosphates identiques aux 4 nucléotides classiques obtenus par hydrolyse alcaline de l'ARN ;

— d'autre part des nucléosides 5' phosphates, isomères des précédents, à l'état de monophosphates. En outre, et de la même façon que les dérivés phosphates bien connus de l'adénosine, les dérivés 5' phosphates de la guanosine, de la cytidine et de l'uridine sont également présents à l'état de di et triphosphates.

La présence d'inosine triphosphate (ITP) et d'inosine monophosphate (IM_5P), nucléotides désaminés dérivés de l'ATP et de l'AM_5P dont on a signalé la présence dans les extraits de levure (34-37-229), n'a pas été mise en évidence dans nos essais. Nous n'avons pas davantage identifié l'acide urique parmi les constituants acido-solubles des levures non autolysées contrairement au fait signalé par SCHMITZ (229).

Par contre, c'est à notre connaissance la première fois que l'acide orotique (4 carboxy-uracile) est mis en évidence à l'état libre dans les cellules de levure. On a montré que ce dérivé de l'uracile est un précurseur des nucléotides pyrimidiques de l'ARN des tissus animaux à la fois « in vivo » (9-211) et « in vitro » (267-268). On a également montré que l'acide orotique peut remplacer l'uracile comme facteur de croissance de certains microorganismes (164-212) ; mais le travail de MITCHELL et coll. (189) avec différentes souches de *Neurospora*, a amené ces auteurs à conclure que l'acide orotique ne constitue pas un intermédiaire naturel dans la biogénèse des nucléotides pyrimidiques de l'ARN, mais qu'il doit être plutôt considéré comme un produit secondaire pouvant s'accumuler dans des conditions très particulières.

Or, en même temps que l'acide orotique libre identifié dans nos essais, des composés pyrimidiques tels que l'uracile, l'uridine et ses dérivés phosphorylés en 3' et en 5' sont également présents. N'est-il pas alors permis de considérer l'acide orotique comme un produit normal du métabolisme cellulaire et d'envisager qu'il participe effectivement chez les

levures à la biosynthèse de molécules pyrimidiques plus complexes au même titre que chez les organismes animaux ?

Les très intéressants et tout récents travaux de KORNBERG et de son école semblent bien venir à l'appui de cette hypothèse. En effet, ces auteurs (139-157) ont partiellement purifié à partir de levure un enzyme, l'orotidine 5' P-phosphorylase, capable de transformer l'acide orotique en uridine 5' monophosphate (UM_5P) en présence du 5' phosphoribosyl-pyrophosphate (PRPP) et par l'intermédiaire de l'orotidine 5' monophosphate (OM_5P). Cette transformation s'effectue selon 2 réactions consécutives, la première donnant lieu à une pyrophosphorolyse réversible, la seconde à une décarboxylation irréversible.

$$1) \text{ — acide orotique} + \text{PRPP} \xrightleftharpoons{OM_5P \text{ phosphorylase}} OM_5P + \text{pyro P}$$

$$2) \text{ —} \qquad OM_5P \xrightarrow{\text{décarboxylase}} UM_5P + CO_2$$

Au même titre que celle de l'UM_5P, la synthèse biologique de l'uridine diphosphate (UDP) et de ses dérivés à partir de l'acide orotique a été également observée à l'aide d'extraits cellulaires animaux (112).

Les uridine mono, di et triphosphates peuvent d'ailleurs donner lieu à des réactions de transphosphorylation avec les composés analogues de l'adénosine et de la guanosine. KORNBERG et coll. (157 *bis*) ont indiqué les divers mécanismes par lesquels une préparation enzymatique isolée de la levure peut catalyser les transphosphorylations entre les uridine, adénosine et guanosine 5' phosphates et réaliser ainsi la biosynthèse de UTP et GTP à partir de leurs monophosphates respectifs. Des réactions similaires ont été mises en évidence à l'aide d'enzymes d'origine animale (107).

Si le rôle des adénosine-phosphates dans le métabolisme cellulaire est désormais bien défini, il n'en est pas de même des dérivés phosphates correspondants de la guanosine de l'uridine et de la cyditine. On a montré l'intervention de UDPG dans la transformation enzymatique du galactose-phosphate en glucose-phosphate (39), mais des travaux plus récents (103) attribuent un rôle identique à l'UTP. On considère actuellement GDP comme le coenzyme nécessaire à la phosphorylation de l'ADP couplée avec la scission du succinyl CoA (10).

Selon les données les plus récentes, les nucléosides triphosphates autres que l'ATP sont considérés comme des agents de phosphorylation fonctionnant dans les systèmes biologiques d'une manière analogue à celle de l'ATP et comme participant à la synthèse des coenzymes. MUNCH-PETERSEN et coll. (192) ont mis en évidence la formation d'UTP chez la levure par pyrophosphorolyse de UDPG sous l'action d'uridyl-transferases.

Enfin certains sont d'avis que, parallèlement à leur rôle de coenzymes ou de précurseurs de coenzymes, les nucléosides 5' phosphates sont susceptibles de participer à l'élaboration des acides nucléiques (230) et comme tels, jouer un rôle important dans la croissance des levures (229). On a signalé à ce sujet qu'un enzyme présent chez divers microorganismes mais absent chez les levures, la nucléotide phosphorylase, synthétise des polynucléotides de même caractère structural que l'ARN à partir de nucléosides 5' diphosphates (96).

Quelle signification peut-on enfin donner à la présence des nucléosides 3' monophosphates identifiés et dosés dans les extraits acido-solubles des levures aux côtés de leurs isomères 5' ? Doit-on les considérer comme des constituants cellulaires normalement préexistants au même titre que les nucléosides 5' monophosphates, ou doit-on plutôt voir en eux des produits résultant d'une dégradation enzymatique de l'ARN ?

En effet, de la même façon que les nucléosides 5' phosphates, ils constituent les unités structurales de l'ARN, puisqu'il est actuellement admis que les mononucléotides des chaînes polynucléotidiques sont unis entre eux par des liaisons phosphodiester 3'-5'. Or, admettre que les nucléotides 3' phosphates mis en évidence résultent d'une dégradation enzymatique de l'ARN, c'est poser en même temps le problème de l'origine de leurs isomères 5'P. Sans prétendre résoudre un problème de cet ordre, les résultats obtenus au cours de la 2e partie de notre travail, apporteront dans ce domaine certaines précisions, du moins en ce qui concerne les pyrimidine 5' phosphates.

II. — LES CONSTITUANTS NUCLÉIQUES DES LEVURES

A. — Teneurs des levures en acides nucléiques.

1. — Teneur en A. R. N.

La diversité des résultats obtenus concernant la teneur en ARN des levures examinées permet difficilement une comparaison avec les valeurs également très diverses publiées dans les travaux antérieurs. La méthode pratiquée par Decker et Dirr (67) faisant intervenir un dosage des purines nucléiques n'a pas tenu compte des rapports moléculaires respectifs des nucléotides puriques et pyrimidiques constituant l'ARN, le rapport purines/pyrimidines n'étant jamais égal à 1 comme nous l'avons vu antérieurement. Les teneurs en ARN signalées par Euler et Hahn (86) ont été obtenues par dosage colorimétrique du ribose, constituant ribonucléique dont la spécificité n'est pas évidente dans tous les cas. Bien qu'ils concernent la totalité du matériel nucléique cellulaire, l'ADN n'ayant pas été déterminé séparément, les résultats de Di Carlo et coll.

(70) obtenus également par mesures spectrophotométriques, sont assez voisins des teneurs rapportées ici. Ces auteurs signalent que l'extraction des acides nucléiques par la soude à froid (NaOH 2,2 p. 100, 1 heure à 10-15°C) donne des chiffres plus faibles que l'extraction trichloracétique à chaud ; mais, compte tenu de nos propres observations, on peut supposer que même dans ce dernier cas l'extraction n'a pas été quantitative.

Di Carlo et coll. (71) admettent que la teneur en acides nucléiques des levures est caractéristique de chaque souche mais est influencée par les conditions de culture. Nous avons constaté comme eux que les levures à teneur élevée en azote présentent également les plus fortes concentrations en ARN, sans que cette relation puisse toutefois être généralisée. Il n'apparaît pas d'autre part que l'abaissement de la teneur en ARN, à mesure que s'accroît l'aération du milieu, réponde à une règle générale car si la levure 1 cultivée en semi-aérobiose présente une teneur élevée en ARN et vérifie cette relation, la levure 2 également riche en ARN, a été cultivée en milieu fortement aéré.

Si l'on considère par ailleurs l'importance quantitative du P ribonucléique dans le matériel phosphoré total des levures, nos résultats aboutissent à des valeurs notablement plus élevées que celles rapportées jusqu'alors par divers auteurs. C'est ainsi que Juni et coll. (121) estiment le P nucléique à 22 p. 100 du P total cellulaire alors que, selon les levures analysées dans cette étude, le P ribonucléique représente de 25,8 à 54,4 p. 100 du P total. En rapportant au phosphore total les résultats présentés par Ebel (83) le phosphore ribonucléique serait compris entre 11 et 18 p. 100 pour des levures ayant reçu une alimentation phosphorée normale ; la proportion ne serait plus que de 5 p. 100 chez une levure « enrichie » en phosphore et s'élèverait à 35 p. 100 chez la même levure « appauvrie » en phosphore. Exprimé en mg/100 g de levure sèche, le P ribonucléique est compris entre 240 et 450 (valeurs extrêmes 213 et 654) selon les résultats de Ogur et coll. (197) ; exprimées sous cette forme, les teneurs que nous avons établies oscillent entre 374 et 903 mg, soit des différences pouvant aller du simple au double.

2. — Teneur en ADN.

Les mêmes observations peuvent être faites en ce qui concerne le phosphore désoxyribonucléique. Ogur et coll. (197) indiquent, pour 100 g de levure sèche, de 13,3 à 18,6 mg de P nucléique (valeurs extrêmes 9,9 et 27,3) alors que nous aboutissons à des teneurs comprises entre 23,2 et 36,8 mg. Les levures de boulangerie et de brasserie analysées se révèlent sensiblement plus pauvres en ADN que les levures du même type pour lesquelles Euler et Hahn (86) ont indiqué une teneur de 0,3 p. 100.

En ce qui concerne la fraction phosphorée non nucléique présente aux

côtés de l'ADN après acidification des hydrolysats alcalins, aucune précision ne peut être apportée sur son identité. Utilisant la même méthode de fractionnement, JUNI et coll. (121) ont constaté que 80 p. 100 du phosphore du précipité ADN-protéines était hydrolysable en ortho-phosphate en 7 minutes par HCl 1N à 100°C. D'après ses caractéristiques analytiques, ce composé ne serait ni du méta, ni du pyrophosphate et les auteurs supposent qu'il s'agirait de ribose-phosphates. La fraction phosphorée non identifiée dans nos essais est beaucoup moins importante surtout chez *S. cerevisiae* Hansen, mais elle est à une plus forte concentration chez les levures de vin et de cidre allant jusqu'à dépasser 50 p. 100 du phosphore total du précipité ADN-protéines chez la levure 7.

Doit-on admettre que cette fraction phosphorée inconnue est formée de ribose phosphates comme JUNI et coll. (121) en ont émis l'hypothèse, ou doit-on plutôt envisager qu'elle constitue une forme de phosphore liée très fortement aux protéines cellulaires précipitées avec l'ADN ? Ceci pourrait alors expliquer les résultats négatifs que nous avons obtenus en essayant de caractériser l'orthophosphate que l'hydrolyse alcaline devrait normalement libérer à partir des phosphoprotéines éventuellement présentes.

3. — Les phosphoprotéines.

En appliquant aux cellules de levure le fractionnement de SCHMIDT-THANNHAUSER, JUNI et coll. (121) ont identifié, aux côtés d'un matériel minéral de nature pyrophosphorique, une fraction phosphoprotéique dont le phosphore représente 2 p. 100 du P total cellulaire soit approximativement 0,03 p. 100 de la levure sèche. La similitude des résultats que nous avons pu obtenir nous-mêmes à l'aide de méthodes faisant intervenir des dégradations de nature chimique (soude) en enzymatique (trypsine) ne permet pas de conclure à l'existence de phosphoprotéines chez les levures examinées.

La mise en liberté de constituants puriques et pyrimidiques, par hydrolyse d'une préparation considérée par THOMAS (252) comme étant de nature phosphoprotéique, met d'autre part en évidence que le phosphore présent est d'origine ribonucléique. Considérant la zymocaséine des levures comme un produit de réserve des cellules, THOMAS a d'ailleurs signalé que cette « phosphoprotéine » absorbait fortement le bleu de toluidine ; le fait que les acides nucléiques présentent eux-mêmes cette affinité vis-à-vis des colorants basiques semble donc bien confirmer que la zymocaséine n'est pas une phosphoprotéine mais, plus vraisemblablement, une protéine souillée d'acide ribonucléique.

4. — Les polyphosphates « insolubles ».

Nous retrouvons, en ce qui concerne la fraction polyphosphates des levures, des divergences analogues à celles intéressant le P ribonucléique entre nos résultats et ceux qui ressortent des travaux antérieurement signalés. Comme la détermination de ces polyphosphates s'effectue parallèlement avec celle de l'ARN, les valeurs obtenues, à l'inverse de celles intéressant le P ribonucléique, sont évidemment plus faibles.

C'est ainsi qu'estimé en mg p. 100 g de levure sèche le P des polyphosphates déterminé dans notre étude est compris entre 26,1 et 209 mg selon les levures, deux d'entre elles en étant même totalement dépourvues. Les résultats obtenus par Ogur et coll. (197) à partir d'une série polyploïde de *Saccharomyces* indiquent une teneur moyenne en P métaphosphorique comprise entre 506 et 691 mg pour 100 g de levure sèche avec pour teneurs extrêmes 392 et 1 003 mg. Wiame (274) a signalé d'autre part les chiffres de 256 et 280 mg de P métaphosphorique par 100 g de poids sec pour une levure initialement carencée puis enrichie en phosphore.

Exprimé en p. 100 du P total, le P des polyphosphates estimé dans nos essais ne dépasse pas la valeur maximum de 11,7 p. 100 (levure 17). Selon Ebel (83) il atteindrait 22 p. 100 chez une levure normale, tomberait à 3,5 p. 100 chez la même levure carencée en phosphore, puis remonterait à 20 p. 100 après enrichissement en phosphore de cette levure appauvrie.

Il est incontestable que les divergences constatées ont pour origine essentielle les méthodes expérimentales utilisées. Même si l'on ne considère que les résultats relatifs aux levures dont l'alimentation phosphorée a été normale au cours de la croissance, ce qui est le cas pour l'ensemble des cultures analysées, nos résultats font apparaître une proportion plus faible de P polyphosphorique et par suite des teneurs plus élevées en P ribonucléique.

Or, les très faibles teneurs en polyphosphates qui caractérisent les levures du type *Saccharomyces cerevisiae* Hansen et *T. utilis* confirment l'observation de Ogur et coll. (181) selon laquelle le métaphosphate « insoluble » est difficilement décelable et pratiquement nul chez les levures de boulangerie commerciales. L'aptitude des levures de cidre et de vin à synthétiser cette forme phosphorée de réserve serait donc nettement plus marquée puisque c'est dans ce groupe que se rencontrent les teneurs les plus élevées en polyphosphates et que, développées sur un milieu normalement équilibré en phosphore, les cellules n'ont pas subi de carence phosphorée préalable.

La présence d'une fraction phosphorée minérale plus ou moins importante, à côté des constituants nucléiques dans le matériel cellulaire acido-insoluble des levures, démontre le manque de spécificité d'une déter-

mination quantitative de l'ARN fondée uniquement sur le phosphore, même lorsqu'il s'agit de levures dont le métabolisme phosphoré n'a pas été perturbé.

B. — Composition nucléotidique de l'ARN de levure.

L'hydrolyse directe de la fraction nucléique sans isolement préalable de l'ARN présente l'avantage d'opérer sur le matériel nucléique total des cellules sans apporter de modifications à sa composition. La méthode présente par contre l'inconvénient de libérer, outre celles de l'ARN, les 2 bases puriques de l'ADN, les liens entre les nucléotides pyrimidiques de l'acide nucléique constituant du noyau cellulaire n'étant pas rompus dans ces conditions. Mais nous avons vu que l'ADN ne représente qu'une très faible fraction des acides nucléiques totaux des levures. L'apport supplémentaire de guanine et d'adénine d'origine désoxyribonucléique demeure inférieur aux erreurs expérimentales inhérentes à la méthode elle-même et ne modifie donc pas de façon appréciable les déterminations concernant l'ARN.

1. — Influence des méthodes d'isolement et de purification.

Les résultats rapportés mettent en évidence que la composition de l'ARN cellulaire est modifiée dès l'instant où l'on procède à son isolement et à sa purification. Il semble d'ailleurs que la purification des échantillons soit davantage responsable des modifications apportées que la méthode d'extraction elle-même. Des 2 méthodes que nous avons utilisées, l'emploi du chlorure de sodium conduit à une préparation brute de composition nucléotidique très voisine de celle de l'ARN cellulaire alors que l'extraction par la soude détermine des modifications plus sensibles. Les méthodes d'isolement actuellement pratiquées ont d'ailleurs définitivement renoncé à l'emploi des agents d'extraction faisant intervenir les pH extrêmes et font appel à des traitements beaucoup moins violents.

En supposant donc que les conditions d'extraction soient telles que l'ARN cellulaire ne subisse aucune transformation, la purification des préparations brutes déterminera presque inévitablement une modification de leur composition. Il apparaît d'ailleurs, à la lumière des résultats obtenus, que la déprotéinisation affecte plus particulièrement les constituants pyrimidiques de l'ARN cellulaire et plus précisément encore l'acide uridylique. Ces observations confirment tout à fait les constatations de Thomas (253) selon lesquelles les échantillons purifiés à partir de préparations commerciales d'ARN de levure accusent un déficit

marqué en bases pyrimidiques. Doit-on alors admettre que la structure de l'ARN comporte certains groupements pyrimidiques particulièrement labiles ?

2. — Homogénéité ou hétérogénéité de l'ARN de levure.

Les différences importantes observées dans la teneur des cellules en nucléotides ribonucléiques illustrent, sous une autre forme, celles qui ont été constatées quant à la teneur en ARN total des diverses levures examinées. Et il semble bien que la nature de la souche, les conditions de culture et la nature du milieu interviennent pour une large part dans cette variabilité. Il apparaît également évident que l'importance quantitative du matériel ribonucléique des cellules est en rapport avec celle des constituants protéiques.

Ces différences disparaissent dès l'instant où l'on considère les proportions moléculaires respectives des nucléotides ribonucléiques. Ainsi, quelle que soit l'importance quantitative de l'ARN dans les cellules, les nucléotides qui le constituent seraient de façon constante associés entre eux dans les mêmes proportions. Il a été déjà amplement démontré, et nos résultats le confirment une fois encore, que cette association des nucléotides n'est pas équimoléculaire et qu'il n'est plus actuellement possible d'envisager une disposition régulière des nucléotides par groupe de 4 dans la chaîne polynucléotidique ainsi que l'avait admis initialement Levene (156).

Quelle que soit l'origine des levures, les ARN qui ont fait l'objet de notre étude ont pour caractère commun de présenter un rapport purines/pyrimidines et uracile/cytosine supérieur à l'unité. Mais le fait que le rapport guanine/adénine soit, selon les levures, supérieur ou inférieur à l'unité, témoigne de l'existence de 2 types d'ARN distincts. Toutes les levures du groupe *S. cerevisiae* Hansen et *T. utilis* présentent un ARN plus riche en guanine qu'en adénine, ce qui confirme les résultats antérieurs de Khouvine et coll. (133) sur les levures du même type. Par contre, l'ARN de la variété *ellipsoideus* ainsi que des espèces *oviformis* et *carlsbergensis*, est caractérisé par une prédominance de l'adénine sur la guanine ; or une préparation d'ARN de levure présentant la même particularité a été obtenue par Markham et Smith (180).

Si d'autre part, ainsi que l'ont proposé Elson et Chargaff (84), on calcule le rapport des bases possédant un groupement — NH_2 en 6 (adénine et cytosine) à celles présentant un groupement — CO — également en 6 (guanine et uracile), on met de la même façon en évidence l'existence de 2 types d'ARN. En effet, pour les levures du groupe *S. cerevisiae* Hansen et *T. utilis*, le rapport moyen adénine + cytosine/guanine + uracile est de 0,868 (valeurs extrêmes 0,832 et 0,896). Ce même rapport

s'élève à 0,94 dans l'autre catégorie de levures (extrêmes 0,896 et 0,981) ce qui correspond assez étroitement dans ce second cas aux résultats obtenus par ELSON et CHARGAFF.

Il semble donc que la composition nucléotidique de l'ARN soit fonction de l'espèce ou de la variété de la levure considérée, mais qu'à l'intérieur d'une même espèce ou d'une même variété cette composition soit constante.

Si par ailleurs les conditions de culture et la nature du milieu exercent une influence certaine sur la teneur des cellules en nucléotides ribonucléiques, donc en ARN, il apparait que la composition moléculaire de l'ARN en nucléotides échappe à cette influence en ce qui concerne un même groupe de levures : les rapports moléculaires de l'ARN des levures 1, 13 et 10 (*S. cerevisiae* Hansen) sont pratiquement identiques bien que les 2 premières aient été récoltées sur un milieu à base de mélasses, l'une en aérobiose partielle, l'autre avec aération intense,et que la levure 10 se soit développée en anaérobiose sur un milieu à base de malt. Ces observations s'opposent aux conclusions de DIMROTH et JAENICKE (77) estimant que la composition de l'ARN de levure est fonction des conditions de culture des cellules : cultivant *T. utilis* dans divers milieux synthétiques ne différant entre eux que par la nature de la source azotée, ces auteurs ont en effet trouvé que le rapport guanine/adénine de l'ARN isolé variait dans de fortes proportions (de 0,6 à 1,3). Par contre, pas davantage que nous-même, THOMAS (253) n'a pu mettre en évidence de différences sensibles dans la composition de l'ARN d'une même levure développée à partir de sources azotées différentes.

Si l'hypothèse d'une influence éventuelle de l'état physiologique des cellules sur la composition de l'ARN a pu être soulevée, on a voulu voir également, dans la variabilité des résultats obtenus à partir de préparations purifiées, l'indice d'une hétérogénéité de l'ARN à l'intérieur des cellules (162). Les résultats de KHOUVINE et coll. (133) mettant en évidence qu'il est possible d'extraire, à partir d'une même levure, plusieurs types d'ARN différant par leur composition nucléotidique, seraient en faveur de cette façon de voir. C'est au terme d'une étude sur les caractères de solubilité de préparations d'ARN isolées dans diverses conditions que MALLETTE et LAMANNA (174) ont conclu à l'hétérogénéité des préparations examinées et envisagé l'existence de plusieurs espèces moléculaires d'ARN à l'intérieur d'une même cellule de levure.

Nos résultats ne nous autorisent ni à infirmer ni à confirmer une telle hypothèse. Au moins mettent-ils en évidence la constance de composition nucléotidique de l'ARN cellulaire à l'intérieur d'une même espèce ou d'une même variété. Bien que ces résultats nous amènent à conclure à l'existence de 2 types distincts d'ARN, selon qu'il y ait prédominance de l'adénine ou de la guanine, ils présentent une certaine similitude

avec ceux obtenus récemment sur la levure par ELSON et CHARGAFF (84).

Le rapport purines/pyrimidines établi par ces auteurs est très sensiblement égal à 1 alors qu'il présente une valeur moyenne de 1,22 dans nos essais. Il n'en reste pas moins qu'une régularité de composition est évidente dans les 2 cas. Cette régularité a pu être observée d'ailleurs par ELSON et CHARGAFF non seulement sur les levures, mais également sur divers microorganismes et de nombreuses préparations biologiques animales ; elle n'apparaît que lorsque l'analyse porte directement sur des extraits bruts et ne fait pas intervenir une purification ultérieure de l'ARN. L'influence des méthodes de purification sur la reproductibilité des résultats se trouve donc une nouvelle fois clairement démontrée.

En résumé, certains faits qui se dégagent de cette étude des constituants puriques et pyrimidiques des levures, tendent à établir une certaine constance de composition du matériel cellulaire que n'affectent ni les conditions ne nutrition et de développement ; c'est du moins ce que semblent montrer les teneurs en azote purique-pyrimidique rapportées à l'azote total, les rapports moléculaires des bases acido-solubles libres et combinées, enfin la composition nucléotidique de l'ARN, quelle que soit la concentration des cellules en acide ribonucléique.

DEUXIÈME PARTIE

LA DÉGRADATION AUTOLYTIQUE DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE CHEZ LA LEVURE

RÉSULTATS OBTENUS

Cette étude qualitative et quantitative de la dégradation autolytique de l'ARN. chez les levures concerne d'une part les produits du catabolisme et plus particulièrement ceux de nature purique et pyrimidique, d'autre part, la fraction cellulaire ribonucléique résiduelle. Les expériences ont été conduites de façon que l'autolyse puisse s'effectuer soit spontanément, soit dans des conditions telles que les activités enzymatiques des cellules soient modifiées.

I. — AUTOLYSE SPONTANÉE

Cette étude a porté sur deux levures manifestant des activités autolytiques différentes, dans les conditions expérimentales décrites antérieurement. Nous avons dans la Figure 5 ci-après exprimé l'essentiel des résultats concernant l'autolyse à 37°C d'une culture pure de *S. cerevisiae* Hansen (lev. n° 1) ; nous allons examiner successivement les résultats intéressant les produits de la dégradation puis la fraction résiduelle.

A. — Produits de la dégradation.

1. — Evolution des composés puriques et pyrimidiques.

La Figure 5 illustre l'évolution des divers composés puriques et pyrimidiques libérés par les cellules de levure au cours de l'autolyse.

Dans les premiers temps de l'incubation à l'étuve et jusqu'au 4e jour, on assiste à une disparition rapide des nucléotides libres, disparition se traduisant par une mise en liberté des bases constituantes ; il n'apparaît pas de cytosine mais les concentrations en adénine guanine et uracile, bien que faibles, augmentent de façon significative. On note également un abaissement progressif de la concentration en acide orotique qui, de 1 µM/g levure sèche au début de l'expérience, passe à 0,3 µM après 5 jours, témoignant d'une plus grande résistance de ce composé à la dégradation comparativement aux nucléotides libres totalement disparus au 4e jour.

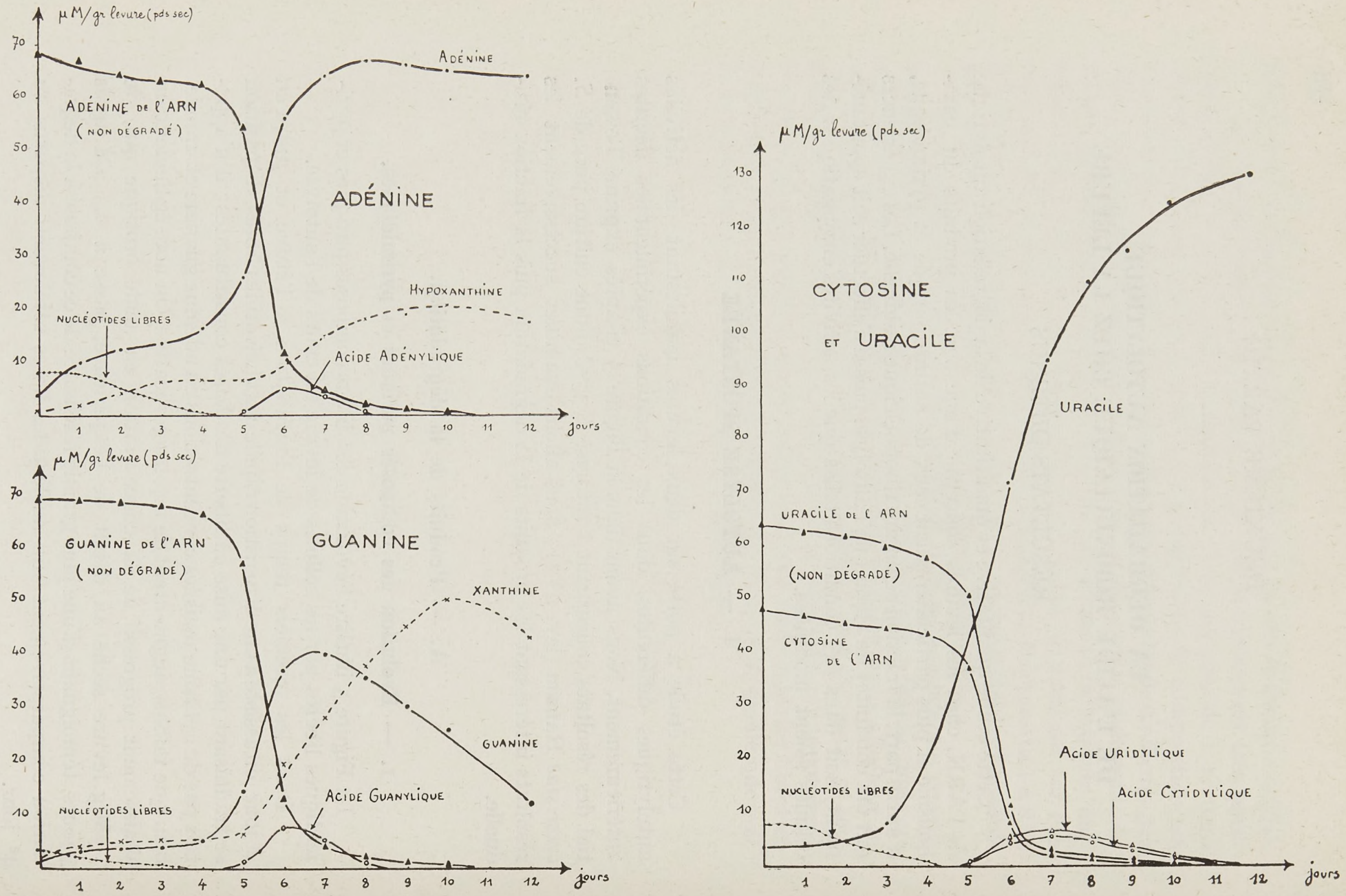


FIG. 5. — Évolution des constituants puriques et pyrimidiques de la levure au cours de l'autolyse spontanée

C'est à partir du 4e jour que l'on observe un accroissement sensible des concentrations en adénine, guanine et uracile libres coïncidant avec une chute rapide de la teneur de la fraction ribonucléique résiduelle en nucléotides correspondants. Cette phase de l'autolyse indique que les composés puriques et pyrimidiques libérés ont essentiellement pour origine l'ARN cellulaire.

Le 5e jour de l'autolyse est caractérisé par l'apparition à l'état libre des 4 ribomononucléotides (nucléosides 3' monophosphates) de l'ARN ; leur concentration atteint son maximum au 6e jour pour les acides adénylique et guanylique, au 7e jour pour les acides cytidylique et uridylique et correspond sensiblement à 10 p. 100 de leur teneur respective initiale dans l'ARN intact. A noter que les concentrations maxima en ribomononucléotides libres sont atteintes au moment où s'atténue la dégradation rapide des nucléotides polymères de la fraction résiduelle. Au 8e jour, les 2 nucléotides puriques sont totalement disparus alors que la présence des 2 nucléotides pyrimidiques est décelable jusqu'au 10e jour. Il est intéressant de noter par ailleurs que l'acide orotique est encore décelable au moment où apparaissent les ribomononucléotides de l'ARN.

Vers le 6e jour, l'analyse chromatographique met en évidence de très faibles traces d'adénosine, de guanosine et d'uridine dont il ne subsiste plus rien 24 heures après.

L'accroissement soudain des concentrations en adénine, guanine et uracile libres observé au 4e jour, continue à se manifester à mesure que se poursuivent les phénomènes de dégradation. Toutefois, au delà du 6e jour la libération de l'adénine et de l'hypoxanthine est ralentie, les concentrations respectives au 10e jour correspondant à une dégradation maxima. Dans le même temps, la concentration en guanine diminue de façon marquée, cependant que celle en xanthine s'accroît jusqu'au 10e jour. Enfin, la concentration en uracile augmente progressivement jusqu'au 12 e jour, sans qu'à aucun moment de l'autolyse il soit possible de mettre en évidence la moindre trace de cytosine.

A compter du 10e jour, les seuls composés puriques et pyrimidiques résultant de la dégradation spontanée des cellules et présents dans l'autolysat sont représentés par l'uracile, l'adénine et la guanine, l'hypoxanthine et la xanthine. Si on exprime les concentrations respectives de ces divers produits par rapport aux concentrations initiales de la levure intacte en bases puriques et pyrimidiques, on constate que la libération des bases est totale après 10 jours, mais qu'au 12e jour les bases puriques, et plus particulièrement la guanine et la xanthine, ont subi à leur tour une dégradation complémentaire.

Les caractéristiques essentielles de cette évolution des produits puriques et pyrimidiques du catabolisme cellulaire d'une levure à faible activité autolytique se retrouvent d'ailleurs quasi intégralement lorsque

p. 100 *de la base totale.*

	adénine		guanine		cytosine-uracile
10 jours					
adénine.....	74,2	98,3	guanine.....	34,2	98,9	uracile 97
hypoxanthine.....	24,1		xanthine.....	64,7	
12 jours					
adénine.....	73,3	93,5	guanine.....	15,3	71,5	uracile 99
hypoxanthine.....	20,2		xanthine.....	56,2	

la levure étudiée s'autolyse rapidement. Voici, en effet, l'essentiel des observations qui ont pu être faites à partir d'une levure de brasserie (*S. cerevisiae* Hansen n° 10) dont la dégradation à 37°C était totale après 4 jours 1/2.

Dès les premières 36 heures la disparition des nucléotides libres est achevée ; les 4 mononucléotides de l'ARN apparaissent eux-mêmes simultanément, leur concentration maximum (12 à 15 p. 100 de leur concentration initiale dans l'ARN intact) étant atteinte 36 heures après le début de l'autolyse ; puis ils disparaissent à leur tour après 2 jours 1/2. C'est à peine si l'on parvient à mettre en évidence de très faibles traces de nucléosides, exception faite de la cytidine. Les concentrations en adénine et guanine libres demeurent pratiquement inchangées cependant que l'autolysat s'enrichit progressivement en hypoxanthine, xanthine et uracile jusqu'à 4 jours 1/2. Les concentrations en bases libres rendent compte que la dégradation jusqu'au stade base est alors quantitativement achevée.

p. 100 *de la base totale.*

	adénine		guanine		cytosine-uracile
4 jours ½					
adénine.....	10,5	99,5	guanine.....	3	97	uracile 98,2
hypoxanthine	89		xanthine.....	94	

Là encore l'autolyse aboutit aux mêmes produits et la cytosine n'a pu être décelée à aucun moment.

2. — Evolution de l'ortho-phosphate.

L'ortho-phosphate constitue un autre des produits ultimes du catabolisme ribonucléique. Mais les acides nucléiques ne représentent pas les seuls constituants phosphorés des cellules. Les nucléotides libres dont la molécule comporte 1, 2 ou 3 groupements phosphoriques, ainsi que les métaphosphates acido-solubles, libèrent également de l'o-phosphate sous l'action de phosphatases spécifiques. On sait également que, dans des conditions très particulières, les levures sont susceptibles d'accumuler

l'acide phosphorique à l'état de polyphosphates minéraux lesquels sont présents aux côtés des acides nucléiques dans la fraction « insoluble » des cellules.

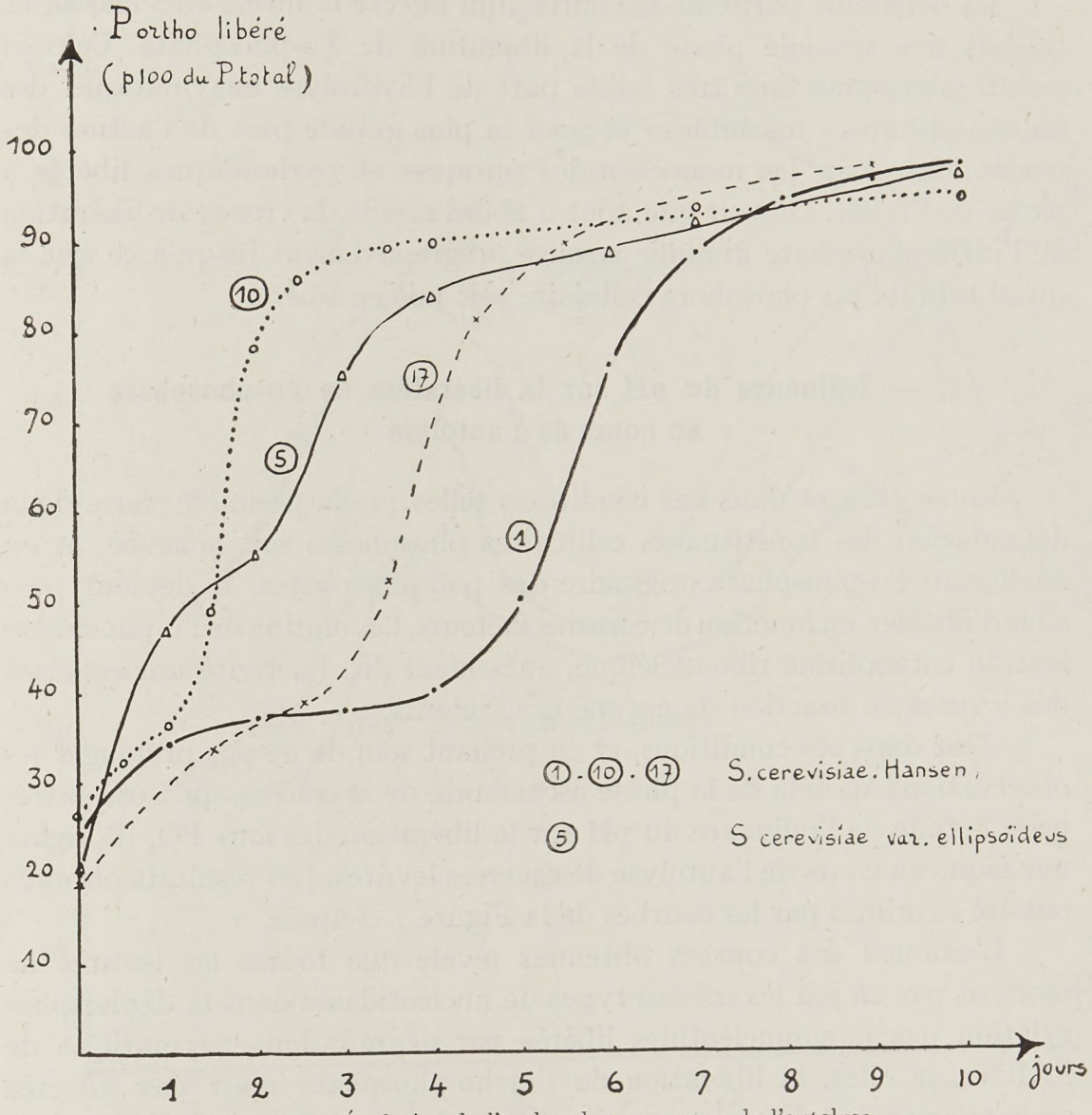


FIG. 6. — Évolution de l'o-phosphate au cours de l'autolyse.

L'ortho-phosphate libéré au cours de l'autolyse peut donc avoir des origines très diverses. En fait, on constate que la courbe exprimant la libération de l'o-phosphate en fonction du temps d'autolyse est caractérisée, quelle que soit la levure étudiée, par une zone d'inflexion plus ou moins étendue et marquée, faisant apparaître 2 évolutions consécutives de l'o-phosphate. L'importance de cette zone d'inflexion intermédiaire (dans certains cas réduite à un simple point) est fonction de la vitesse d'autolyse des levures ; le changement de pente de la courbe se manifeste d'autant plus tôt que la levure s'autolyse plus rapidement et inversement. La Figure 6 où ont été rapportées les courbes d'évolution relatives à diverses levures, illustre ces observations.

La première phase de l'évolution exprime précisément la dégradation autolytique des nucléotides préexistants et des métaphosphates acido-solubles.

La deuxième partie de la courbe, qui affecte la forme en S classique, traduit une seconde phase de la libération de l'o-phosphate. Celui-ci résulte alors pour une très faible part de l'hydrolyse enzymatique des polyphosphates « insolubles » et pour la plus grande part de l'action des nucléotidases sur les monocléotides puriques et pyrimidiques libérés à partir de l'ARN. On voit que, tout d'abord rapide, la vitesse de libération de l'ortho-phosphate diminue ensuite progressivement jusqu'à ce que la quasi totalité du phosphore cellulaire soit mis en liberté.

3. — Influence du pH sur la libération de l'o-phosphate au cours de l'autolyse.

En se plaçant dans des conditions telles que la première phase de la dégradation des constituants cellulaires phosphorés soit achevée, et en négligeant l'o-phosphate originaire des polyphosphates, il devient possible d'étudier, en fonction de certains facteurs, l'évolution de l'o-phosphate issu du catabolisme ribonucléique, autrement dit, l'activité nucléotidase des levures en fonction de ces mêmes facteurs.

C'est dans ces conditions, et en prenant soin de ne pas prolonger les observations au-delà de la phase ascendante de la courbe, qu'a été entreprise l'étude de l'influence du pH sur la libération des ions $PO_4^{\equiv}$ d'origine nucléique au cours de l'autolyse de diverses levures. Les résultats obtenus ont été exprimés par les courbes de la Figure 7 ci-après.

L'examen des courbes obtenues révèle que toutes les levures ne mettent pas en jeu les mêmes types de nucléotidases dans la déphosphorylation des mononucléotides libérés par dégradation enzymatique de l'ARN ; en effet, la libération de l'ortho-phosphate n'est pas affectée de la même façon d'une levure à l'autre par les variations de pH. Il semble que les levures puissent être en ce sens réparties en 2 groupes distincts : celles dont l'activité nucléotidase présente un seul optimum vers pH 6,5-7 et celles manifestant 2 activités différentes, l'une en milieu acide (pH 4-4,5) l'autre en milieu alcalin (pH 8-9).

Cette répartition des levures en 2 catégories, d'après leur aptitude à déphosphoryler les nucléotides selon la réaction du milieu, semble d'ailleurs s'accorder assez bien avec l'activité autolytique manifestée par les cellules. Des déterminations de pH effectuées sur les suspensions cellulaires à divers stades de l'autolyse ont montré que le pH des autolysats, malgré un léger déplacement vers la zone alcaline, se maintenait tout au long de la dégradation dans des limites assez étroites, entre 5,5 et 6,5 quelle que soit la levure. Autrement dit, toutes les activités enzymatiques

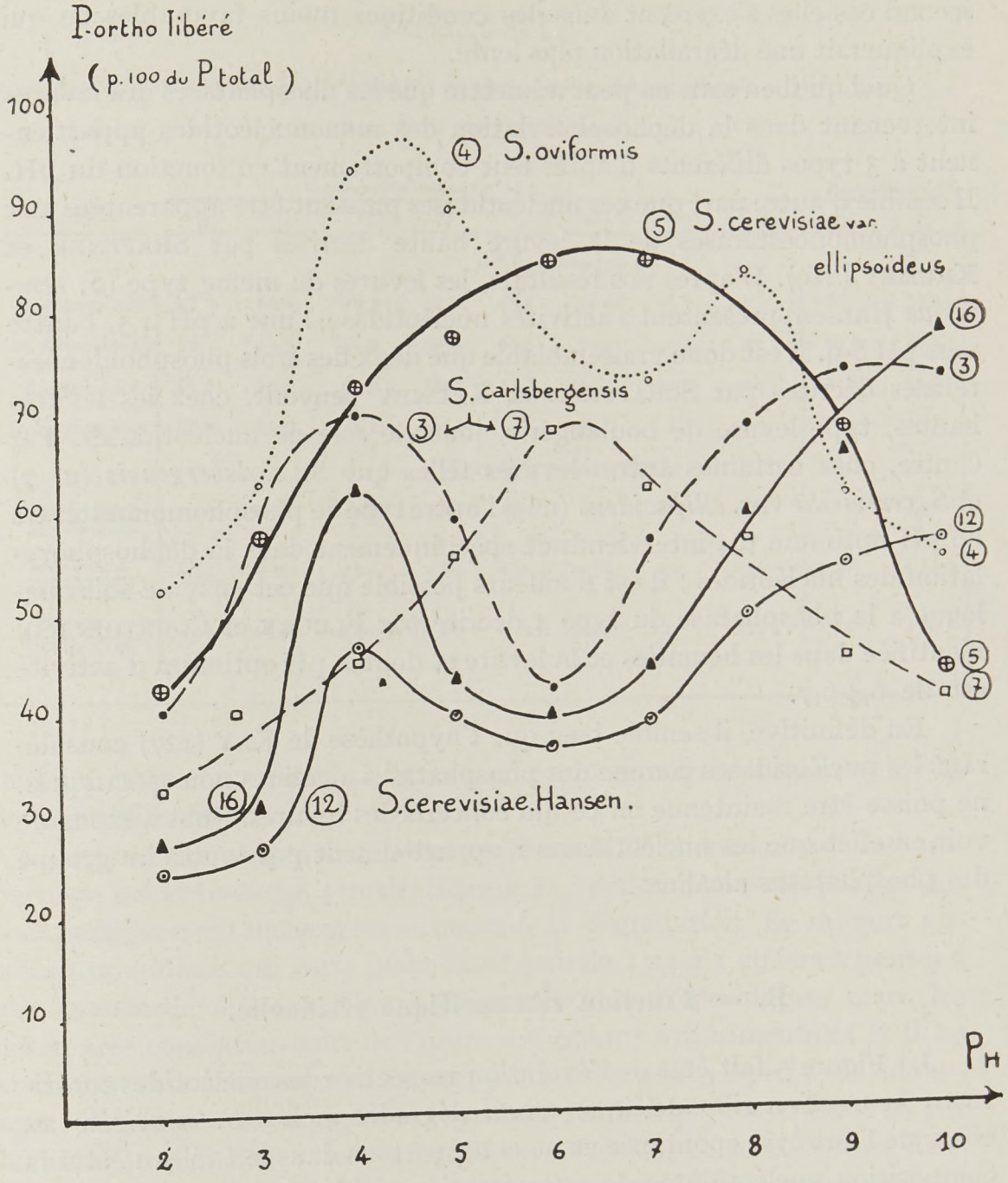


Fig. 7. — Influence du pH sur la libération de l'o-phosphate au cours de la dégradation autolytique de l'ARN.

au cours de l'autolyse s'exercent dans cette zone limitée de pH, comprise entre 5,5 et 6,5, ce qui s'explique assez bien si l'on considère le pouvoir tampon élevé d'un tel milieu. Or il se trouve que les levures dont l'activité nucléotidase est optima à pH 6,5 -7 (levures 5, 6 et 7) sont précisément celles qui s'autolysent rapidement, alors que les levures s'autolysant plus lentement (levures 3-12-16) sont, à une exception près (levure 4), celles dont les activités nucléotidase optima se situent en dehors de la zone de pH des autolysats. Dans les premiers cas les activités enzymatiques sont favorisées par la réaction du milieu, d'où dégradation rapide ; dans le

second cas elles s'exercent dans des conditions moins favorables ce qui expliquerait une dégradation plus lente.

Quoi qu'il en soit, on peut admettre que les phosphatases des levures intervenant dans la déphosphorylation des mononucléotides appartiennent à 3 types différents d'après leur comportement en fonction du pH. Il semble d'autre part que ces nucléotidases puissent être apparentées aux phosphomonoestérases de la levure haute décrites par SHAFFNER et KRUMEY (219). D'après nos résultats, les levures du même type (*S. cerevisiae* Hansen) présentent 2 activités nucléotidase, l'une à pH 4,5, l'autre vers pH 8-9. Il est donc vraisemblable que deux des trois phosphomonoestérases décrites par SCHAFFNER et KRUMEY peuvent, chez les levures hautes, type levure de boulangerie, jouer le rôle de nucléotidases. Par contre, chez certaines autres levures telles que *S. carlsbergensis* (n° 7) et *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (n° 5) l'autre type de phosphomonoestérase de pH optimum 6,4 interviendrait spécifiquement dans la déphosphorylation des nucléotides ; il est d'ailleurs possible que cet enzyme soit analogue à la phosphatase du type 4 décrite par FLEURY et COURTOIS (89) identifiée dans les hématies et la levure et dont le pH optimum d'activité est de 6,4-6,7.

En définitive, il semble bien que l'hypothèse de KAY (127) considérant les nucléotidases comme des phosphatases alcalines non spécifiques, ne puisse être maintenue en ce qui concerne les levures. Nous venons de voir en effet que les nucléotidases n'appartiennent pas toutes au groupe des phosphatases alcalines.

B. — Fraction ribonucléique résiduelle.

La Figure 5 fait état de l'évolution respective des nucléotides constituant la fraction ribonucléique « non dégradée » chez *S. cerevisiae* au cours de l'autolyse spontanée et nous rapportons dans le tableau XIX la composition nucléotidique de cette fraction résiduelle telle qu'elle a été déterminée aux divers stades de la dégradation.

Jusqu'au 4^{e} jour, on assiste à une baisse progressive mais très faible de la teneur en chacun des 4 nucléotides ; il y aurait peut-être là l'indice d'une dépolymérisation du complexe polynucléotidique, doublée d'une mise en liberté de composés à faible poids moléculaire dont l'analyse n'a d'ailleurs pas décelé la trace. Entre le 4^{e} et le 5^{e} jour d'autolyse, s'amorce une diminution plus marquée de la teneur en nucléotides, diminution s'accentuant brutalement entre le 5^{e} et le 6^{e} jour alors qu'apparaissent simultanément à l'état libre les acides adénylique, guanylique, cytidylique et uridylique. Au 6^{e} jour, les nucléotides constituant la fraction nucléique résiduelle ne représentent plus que 17 p. 100 environ de la teneur

Tableau XIX

Composition nucléotidique de la fraction ribonucléique résiduelle au cours de l'autolyse

	S. cerevisiae Hansen (n°1)								S cerev. Hansen (n°9)	
APRÈS	0j	1j	2j	3j	4j	5j	6j	9j	0j	7j
	µM/gr levure (pds sec)									
AC. GUANYLIQUE	69,7	69,4	68,9	67,9	66,3	56,6	13,3	1,4	49	29,4
AC. ADÉNYLIQUE	68	66,5	64,5	63,4	62,5	54,4	11,6	1,3	44,2	27,8
AC. URIDYLIQUE	63,5	62,5	61,5	59,7	57,3	50,4	11,3	1,1	41,5	25,7
AC. CYTIDYLIQUE	48,1	46,5	45,8	44,5	43,4	37	8	0,9	32,4	18,3
	RAPPORTS MOLÉCULAIRES									
AC. GUANYLIQUE / AC. ADÉNYLIQUE	1,02	1,04	1,06	1,07	1,06	1,04	1,14	1,07	1,10	1,05
AC. URIDYLIQUE / AC. CYTIDYLIQUE	1,32	1,34	1,34	1,34	1,32	1,36	1,41	1,22	1,28	1,40
PURINES / PYRIMIDINES	1,23	1,24	1,24	1,26	1,27	1,27	1,29	1,35	1,26	1,30

initiale, cette concentration diminuant ensuite progressivement jusqu'à devenir nulle au 10e jour.

Les valeurs rapportées dans le tableau XIX montrent que les proportions respectives des 4 nucléotides de la fraction ribonucléique demeurent pratiquement inchangées au cours de la dégradation. Le rapport purines/pyrimidines qui varie jusqu'au 6e jour de 1,23 à 1,29 ferait penser à une éventuelle mise en liberté de nucléotides pyrimidiques mais les différences constatées sont de l'ordre des erreurs expérimentales et il ne saurait en être tenu compte. Les rapports acide guanylique/acide adénylique et acide uridylique/acide cytidylique ne mettent d'ailleurs pas davantage en évidence de modifications sensibles. Cette constance dans les proportions moléculaires respectives des nucléotides composant la fraction non dégradée s'accorde d'ailleurs avec le fait que les mononucléotides libres identifiés dans les produits de dégradation, apparaissent tous les 4 et simultanément.

Les résultats figurant sur le tableau XIX parallèlement aux précédents concernent la composition de la fraction nucléique résiduelle d'une levure industrielle de distillerie (*S. cerevisiae* Hansen n° 9) après 7 jours d'autolyse à 37°C ; ils ne font pas apparaître que les proportions moléculaires des nucléotides de l'ARN initial ont subi des modifications profondes pouvant témoigner d'une libération préférentielle de certains d'entre eux.

C. — Catabolisme des bases et du ribose.

1. — Bases puriques et pyrimidiques.

La détermination quantitative des bases puriques et pyrimidiques libérées en fonction du temps permet de préciser le stade de l'autolyse qui correspond à une dégradation totale. Nous avons vu, dans le cas de la levure 1, que l'on retrouve après 10 jours la quasi totalité des constituants puriques et pyrimidiques des cellules à l'état de bases libres ; mais en prolongeant de 48 heures le séjour des autolysats à l'étuve, les déterminations font ressortir un abaissement sensible de la concentration en purines affectant principalement guanine et xanthine et, dans des proportions moindres, adénine et hypoxanthine.

Cette disparition des bases succédant à la dégradation totale des cellules et de l'ARN a été observée à plusieurs reprises à des degrés divers selon les levures étudiées. Aussi avons-nous rassemblé les observations effectuées en ce sens en rapportant dans le tableau XX ci-dessous la composition des autolysats de différentes levures ayant effectué la dégradation de leur matériel ribonucléique.

Les résultats sont exprimés en p. 100 des purines ou des pyrimidines totales et nous indiquons parallèlement pour chaque groupe les proportions correspondantes de chaque base dans les levures non autolysées.

TABLEAU XX

Composition des autolysats de levure après dégradation totale de l'ARN

		S. cerevisiae Hansen						S. carlsberg.	S. cer. var ellipsoïdeus	
		Boulangerie				Brasserie		Cidre	Vin	
LEVURE n°		1		12		10		7	5	6
DURÉE D'AUTOLYSE		10 j	12 j	8 j	14 j	4½ j	12 j	10 j	7 j	7 j
		p 100 des PURINES TOTALES								
LEVURES NON AUTOLYSÉES	ADÉNINE TOTALE	53,1		53,6		56		55,3	52,7	53,3
	GUANINE TOTALE	46,9		46,4		44		44,7	47,3	46,7
PRODUITS LIBÉRÉS APRÈS AUTOLYSE TOTALE	ADÉNINE	39,4	38,9	37,3	0	6	0	0	0	0
	HYPOXANTHINE	12,8	10,7	14,4	45,5	50,8	47	0	0	0
	GUANINE	16	7,1	32,1	0	1,3	0	0	0	0
	XANTHINE	30,3	26,3	12,8	51,3	40,9	18,1	3,1	0	0
	AC. URIQUE						8	53,6	44,4	29,3
	ALLANTOÏNE						1,6	0,6	2,2	2,7
	AC. ALLANTOÏQUE						3	0	5	2,3
	AC. GLYOXYLIQUE						1,4	0	0	0,4
	TOTAL	98,5	83	96,6	96,8	99	79,1	57,3	51,6	34,7
		p 100 des PYRIMIDINES TOTALES								
LEVURES NON AUTOLYSÉES	CYTOSINE TOTALE	41,5		41,3		41,8		42,2	39,5	44
	URACILE TOTAL	58,5		58,7		58,2		57,8	60,5	56
PRODUITS LIBÉRÉS APRÈS AUTOLYSE TOTALE	URACILE	97	99	98	75,2	98	76,5	44,3	97	0

Nous avons précédemment exprimé sous une autre forme et rendu compte des résultats concernant la levure 1. Avec la levure 12, une prolongation de 6 jours de l'incubation de l'autolysat à 37°C après la dégradation totale se traduit par un abaissement notable de la concentration en uracile, celle en purines restant inchangée. Mais on constate toutefois une disparition totale de la guanine et de l'adénine et un accroissement correspondant des teneurs en xanthine et hypoxanthine, une certaine fraction de l'hypoxanthine ayant d'ailleurs été oxydée en xanthine.

Pour la levure 10, à forte activité autolytique, la dégradation est totale après 4 jours 1/2. En prolongeant jusqu'à 12 jours le séjour à 37°C, on ne trouve plus trace d'adénine et de guanine et les concentrations en hypoxanthine et surtout en xanthine se sont fortement abaissées ; par contre on met en évidence, à l'aide des méthodes colorimétriques décrites, des quantités non négligeables d'acide urique, d'allantoïne, et des acides allantoïque et glyoxylique. Parallèlement on observe un abaissement d'environ 25 p. 100 de la concentration en uracile.

Si l'on envisage le cas des levures 5,6 et 7, on constate qu'au stade où la dégradation de l'ARN est totale, les autolysats (exception faite de la levure 7 où subsistent quelques traces de xanthine) sont totalement dépourvus de bases puriques. On met par ailleurs en évidence des concentrations variables d'acide urique, d'allantoïne,d'acides allantoïque et glyoxylique ne rendant compte que partiellement de la transformation des purines totales de la levure. Une fraction importante des purines a donc été soumise à d'autres types de tranformations échappant à l'analyse. En ce qui concerne les pyrimidines, on ne décèle pas la moindre trace d'uracile avec la levure 6 ; on en retrouve environ la moitié pour la levure 7 et la quasi totalité pour la levure 5.

Des essais ont été entrepris pour tenter de mettre en évidence les produits de dégradation de l'uracile éventuellement présents dans les autolysats des levures 6 et 7. Des tentatives d'isolement par chromatographie sur papier de certains dérivés tels que les acides barbiturique et malonique n'ont conduit à aucun résultat significatif.

Avant d'en arriver aux conclusions qu'impliquent ces résultats, il est utile de faire état d'une objection ne pouvant manquer d'être soulevée. Une fois accomplie la dégradation de l'ARN jusqu'au stade bases, les transformations enzymatiques observées, après un séjour anormalement prolongé des autolysats à 37°C, ne résultent-elles pas davantage des contaminations microbiennes qui ne peuvent manquer de se développer dans de telles conditions, que des levures elles-mêmes ?

Il est certain que le maintien prolongé des autolysats à 37°C favorise leur pollution ; il ne peut donc être question de considérer comme nul le rôle joué par les microorganismes étrangers dans cette phase ultime de l'autolyse.

Il est cependant difficile d'admettre que les phénomènes observés sont le seul fait des actions microbiennes et que les levures n'y ont aucune part. Nous pensons au contraire que le rôle des enzymes libérés par les cellules de levure continue à être prédominant même dans ces conditions. Comment expliquer en effet, toutes conditions expérimentales étant égales, que tel autolysat (lev. nº 12) après être demeuré 14 jours à 37ºC voit sa concentration en purines libres rester inchangée et celle en uracile diminuer de 25 p. 100, alors que chez tel autre (lev. nº 6) la totalité des bases puriques et pyrimidiques est disparue après 7 jours seulement d'incubation.

Tout en faisant donc les réserves qu'imposent obligatoirement les conditions de l'expérience à ce stade avancé de l'autolyse, nous dirons donc que les levures semblent posséder des systèmes enzymatiques capables de dégrader les bases puriques et pyrimidiques. Les activités qu'elles paraissent manifester en ce sens diffèrent d'ailleurs de façon importante d'une souche à l'autre. Il semble en outre que leur équipement enzymatique leur permette, à des degrés divers, de dégrader les bases puriques plus facilement que l'uracile. Nous verrons plus loin que de telles conclusions rejoignent de manière assez favorable certains faits antérieurement établis (72-74-75).

2. — Ribose.

Contrairement à l'ortho-phosphate, produit minéral de la dégradation de l'ARN, le ribose libéré ne s'accumule pas dans le milieu, mais subit à son tour une série de transformations, encore incomplètement connues, se traduisant par une diminution plus ou moins rapide de sa concentration en fonction du temps. Ainsi que nos résultats l'indiquent, cette évolution du ribose au cours de l'autolyse diffère selon les levures.

Opérant sur des cellules entières, il n'était pas possible de faire une différenciation entre le ribose d'origine nucléique et celui dérivant des constituants acido-solubles. La méthode analytique utilisée n'a permis d'ailleurs qu'une détermination globale de la somme (ribose libre + ribose lié aux purines), le ribose lié aux pyrimidines échappant à la détermination. Néanmoins l'étude de l'évolution des formes acido-solubles du ribose libéré au cours de l'autolyse a permis de préciser un des aspects du catabolisme ribonucléique.

La Figure 8 illustre les résultats obtenus à partir de plusieurs levures différentes ; afin de pouvoir être comparées, les teneurs en ribose déterminées aux divers stades de l'autolyse ont été rapportées aux teneurs initiales des cellules non autolysées. On constate que la plupart de ces courbes d'évolution sont caractérisées par 2 maxima, d'importance variable selon les levures, les concentrations en fin d'autolyse accusant dans tous les cas une diminution marquée. Par ailleurs, alors que chez certaines levures et particulièrement chez *S. cerevisiae* Hansen, la concentration

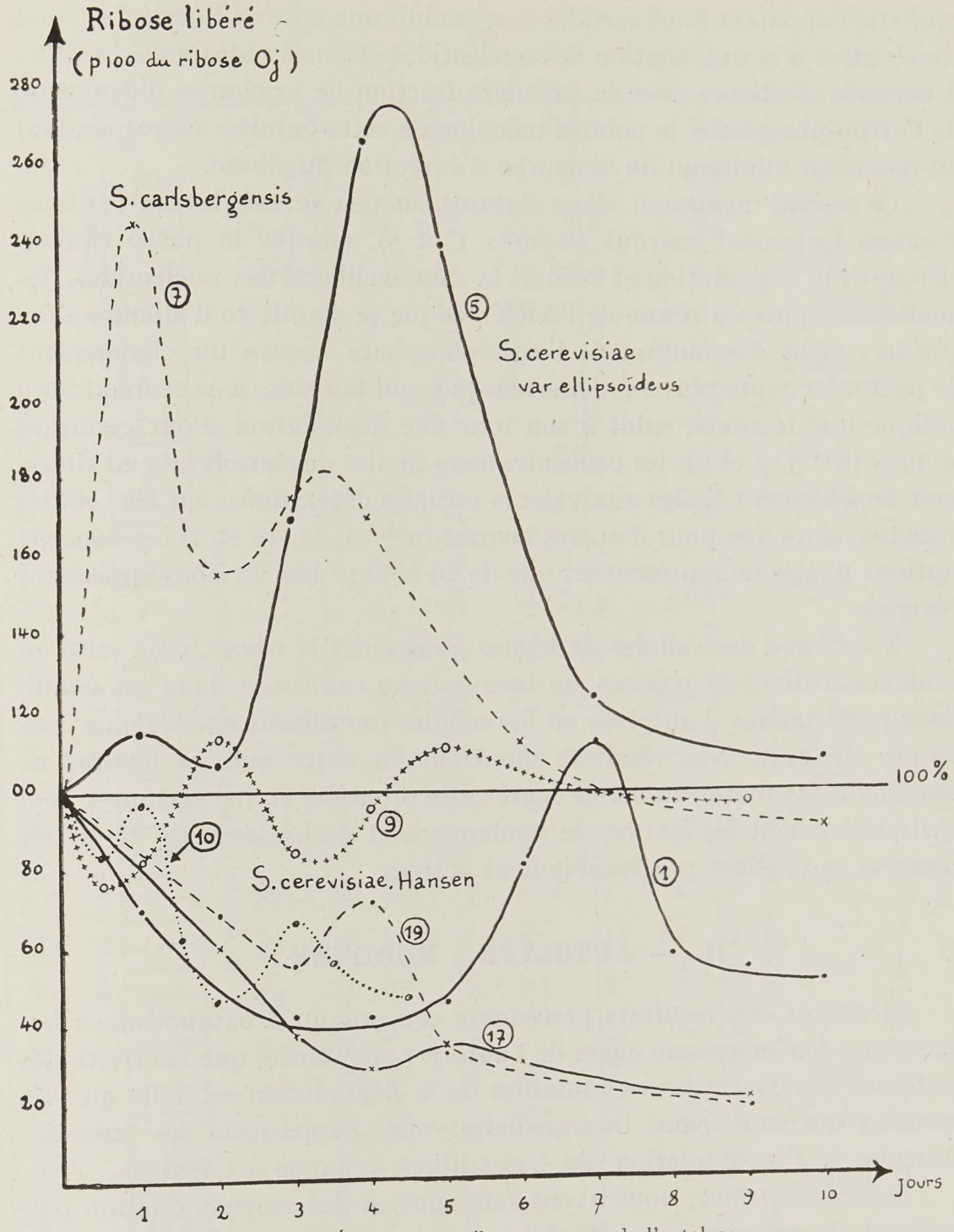


Fig. 8. — Évolution du ribose au cours de l'autolyse.

en ribose acido-soluble demeure voisine ou inférieure à la concentration initiale, chez d'autres (*S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *S. carlsbergensis*) la quantité libérée peut être, à un stade donné, supérieure de 2 à 3 fois à ce qu'elle était à l'origine.

On doit noter que chaque maximum se situe à une phase de la dégradation où se produit une libération importante de ribose libre ou lié. Et l'aptitude des enzymes cellulaires à dégrader le ribose ainsi libéré est en raison inverse de l'importance des maxima observés. Le premier maxi-

mum non apparent dans certains cas, traduit une mise en liberté de ribose consécutive à la dégradation des nucléotides et nucléosides préexistants ; il coïncide d'ailleurs avec la première fraction de la courbe d'évolution de l'ortho-phosphate, le point d'inflexion de cette dernière correspondant lui-même au minimum de la courbe d'évolution du ribose.

Le second maximum, dans certains cas peu accusé (levure 17) dans d'autres fortement marqué (levures 1 et 5), marque la phase ribonucléique de la dégradation et traduit la mise en liberté des nucléotides, des nucléosides puis du ribose de l'ARN ; ce pic se manifeste d'ailleurs alors que la courbe d'évolution de l'orthophosphate accuse un changement de pente. La chute plus ou moins marquée qui fait suite à ce 2e maximum indique que le ribose subit à son tour une dégradation. Pour certaines levures (nos 5, 7 et 9), les concentrations finales des autolysats en ribose sont sensiblement égales aux valeurs initiales déterminées sur les cellules intactes, alors que pour d'autres levures (nos 19, 17, 10 et 1) ces concentrations finales ne représentent que de 20 à 50 p. 100 du ribose présent à l'origine.

L'aptitude des cellules de levure à dégrader le ribose, déjà mise en évidence à diverses reprises, se trouve donc confirmée dans ces conditions particulières d'autolyse où les cellules fournissent elles-mêmes leur propre substrat. Nos résultats montrent en outre que les levures ne possèdent pas toutes au même degré cette propriété et que certaines, tout particulièrement les levures de boulangerie et de brasserie (*S. cerevisiae* Hansen) se révèlent particulièrement actives.

II. — AUTOLYSE « MODIFIÉE »

Il ressort des résultats précédents concernant le catabolisme ribonucléique des levures au cours de l'autolyse spontanée, que l'activité des systèmes enzymatiques responsables de la dégradation est telle que les produits du catabolisme intermédiaire, entre l'apparition des mononucléotides et l'accumulation des bases libres, échappe à l'analyse.

En conséquence, nous avons fait appel à des moyens d'étude permettant de ralentir sinon d'inhiber totalement l'activité des systèmes enzymatiques en cause et par suite de favoriser l'acccumulation des composés intermédiaires de la dégradation non décelés dans l'autolyse spontanée.

Deux séries d'expériences ont été consacrées à cette étude de l'autolyse « modifiée » des levures, la première utilisant la destruction thermique des enzymes cellulaires à divers stades de l'autolyse, la seconde faisant appel à une gamme assez étendue et variée d'effecteurs d'enzymes.

Nous avons rassemblé dans le tableau XXI suivant les résultats obtenus dans ces diverses conditions. Les valeurs concernant les produits

Tableau XXI

DÉGRADATION AUTOLYTIQUE DE L'ARN DE LEVURE

ACTION D'EFFECTEURS D'ENZYMES — DE LA CHALEUR

	Cystéine formol Ag^{++} Hg^{++}	Cu^{++}	Sulfure	Cyanure	Fluorure	Iodacétate	Nitrure	Arsénite	Arséniate	Auréomycine	Streptomycine	Pénicilline	Cétavlon	Co^{++}	2.4 Dinitrophénol	Mn^{++}	Témoin (10 j)	Cellules traitées 10 min à 100°C (après ... jours d'autolyse) ½	1	1½	2	3	Témoin 4½
COMPOSÉS LIBÉRÉS (p 100 des nucléotides de l'A.R.N.)																							
Ac. Adénylique		15,6	40,1	87,7	64,3	96,5	28,6			6,3	6,6	6,9						13,3	19,3	19,3	1,4		
Adénosine			9,1		20	5	40			5	6,7	2	9,4	11,3					13	23	40		
Inosine										4,5	4,4	4	2,8							3,3			
Adénine							30	87,7	73,1	79	77	82	81	65,4	79,1	98	84,4			17,3	52	63,8	47,2
Hypoxanthine								11,7						22,7	13		15,6					37	54,7
Total:	0	15,6	49,2	87,7	84,3	101,5	98,6	99,4	73,1	94,8	94,7	94,9	93,2	99,4	92,1	98	100	13,3	32,3	62,9	93,4	100,8	101,9
Ac Guanylique		19	27,7	83	68,6	100	43,7			29	27,2	33,2	5,9	21	12			14,7	20,2	25,1	9,5		
Guanosine		5,3	3,2		22		15,4			6	3,6	3	4	3	3				8,2	10	40		
Xanthosine											6,5	5,6	7			3,2				1,4			
Guanine			9,5				41,3	47	35,1	33	30,6	37,2	33	46	76,6	57,3	33,2			20	40	56,7	23,2
Xanthine								53	37,1	27,3	26,3	17,2	40	26,6		36	66,8			2		44,5	76,3
Total	0	24,3	40,4	83	90,6	100	100,4	100	72,2	95,3	94,2	96,2	89,9	96,6	91,6	96,5	100	14,7	28,4	56,7	89,5	101,2	99,5
CDP						12,7									5			20,3	25,8	23	2,2		
Ac Cytidylique		20,8	26,8	94,2	55,1	82,3	15,6	28,8		10,7	13,7	15,6	2	89,1					3,3	1,6	3,6	1	
Cytidine		6,6			44	5,7	28,8	28,8	10,7	35,4	34,3	30,8	43,5	5,9									
" désaminée							52,4												5				
Cytosine										12,7	5,4	6,6	6,5	5	3	38,5				29	75	89	100
" désaminée			16					45,2	62,5	38,7	39,3	41,2	46		89	60,5	100						
Total:	0	27,4	42,8	94,2	99,1	100,7	96,8	102,8	73,2	97,5	92,7	94,2	98	100	97	99	100	20,3	34,1	53,6	80,8	90	100
UDPAG							8,9			7,7	10,5	10,2											
UDP						17,9									20			16,5	28,5	46,5	1		
Ac Uridylique		29,6	50,9	96	68,8	84,8	55	34,5		21,2	22,8	22	22,8		3,1	8,5					2,3		
Uridine					28		36	20,3	66	17,3	20,4	20	20	102						18	73,5	89	100
Uracile								45		44,8	41,5	44,8	54,8		72,1	90,5	100						
Total.	0	29,6	50,9	96	96,8	102,7	99,9	99,8	66	91	95,2	97	97,6	102	95,2	99	100	16,5	28,5	64,5	80,8	89	100
FRACTION RÉSIDUELLE (p 100 des nucléotides de l'A.R.N.)																							
Ac. Adénylique	100	86,3	52,2	12,5	13,4	-	-	-	26,9	1,7	5	3,5	5,2	-	4	1,7	-	84,4	67,7	37,1	6,2	-	-
" Guanylique	100	75,2	58,6	16,2	8,2	-	-	-	29,6	2,1	4,7	2,3	5,7	-	4,6	1,7	-	85	71	43	8,2	-	-
" Cytidylique	100	79,6	57,1	5,7	4,1	-	-	-	25,1	2,5	7,3	5,8	2	-	3	1	-	79,7	65,9	46,5	19,1	10	-
" Uridylique	100	75,6	53,5	5,5	5,2	-	-	-	33,6	2,7	4,8	2,8	0,8	-	3,9	1,4	-	83	71,5	35,4	20,1	11,5	-
Purines / Pyrimidines	1,23	1,28	1,24	3,12	2,80	-	-	-	1,15	0,93	0,98	0,87	5	-	1,47	1,71	-	1,30	1,26	1,25	0,46	-	-
RIBOSE LIBÉRÉ (p 100 du ribose 0 j)																							
	115	183	-	450	-	385	395	255	160	523	521	531	456	486	62	551	50						

intermédiaires accumulés ont été rapportées à l'ARN en tenant compte de l'importance quantitative des constituants cellulaires puriques et pyrimidiques préexistants. Nous examinerons donc successivement la nature des composés qu'il a été possible de mettre ainsi en évidence puis l'action exercée par les effecteurs utilisés sur les enzymes du catabolisme ribonucléique.

A. — Composés puriques et pyrimidiques de la dégradation.

1. — Inhibition thermique.

Cette étude a été effectuée sur *S. cerevisiae* Hansen (levure de brasserie n° 10) à forte activité autolytique effectuant la dégradation totale de ses constituants cellulaires en 4 jours 1/2 à 37°C. On répartit dans une série d'erlens des quantités égales de levure en suspension dans l'eau stérile (1 g poids sec/10 cm^3) que l'on dépose à l'étuve à 37°C. Toutes les 12 heures, on porte pendant 10 minutes à 100°C le contenu de l'un des erlens de la série lequel, après avoir été ramené à 37°C, est remis à l'étuve de façon que la durée totale d'autolyse soit de 4 jours 1/2. On réalise ainsi, à partir de la suspension de levure initiale, une série d'autolysats dont le premier a été soumis à l'action de la chaleur après 12 heures, le second après 24 heures, le troisième après 36 heures etc., et ceci jusqu'à 3 jours, la suspension non traitée constituant l'essai témoin.

L'analyse des composés puriques et pyrimidiques libérés dans ces conditions permet de mettre en évidence des mononucléotides, des nucléosides et des bases.

On a vu que l'autolyse spontanée permettait de déceler les 4 mononucléotides à une concentration maximum représentant 10 p. 100 environ de leur concentration dans l'ARN non dégradé. Par inhibition thermique, cette concentration s'élève jusqu'à 20-25 p. 100 et même jusqu'à 46 p. 100 dans le cas de l'acide uridylique. Les 2 nucléosides puriques adénosine et guanosine sont de même nettement caractérisés ; on met également en évidence les 2 nucléosides pyrimidiques mais dans des proportions notablement plus faibles. Dans l'essai ayant subi l'inhibition thermique après 1 jour 1/2, on note la présence aux côtés de l'adénosine et de la guanosine, de faibles quantités d'inosine et de xanthosine. Enfin, une faible fraction de cytosine, la seule des 4 bases non caractérisée dans l'autolyse spontanée, a échappé à la dégradation.

2. — Action des effecteurs d'enzymes.

Les expériences comportant l'emploi d'effecteurs aux concentrations indiquées antérieurement, ont été effectuées sur une culture pure de *S. cerevisiae* Hansen (levure n° 1). Les essais d'autolyse spontanée sur la

même levure ont montré que la dégradation à 37°C était totale après 10 jours.

En présence d'effecteurs d'enzymes la dégradation de l'ARN est modifiée de telle sorte que l'on assiste dans certains cas à une accumulation considérable de composés intermédiaires. On retrouve dans ces conditions les mêmes types de composés que dans les expériences précédentes et les stades nucléotide et nucléoside deviennent particulièrement apparents. Mais pour la première fois, sont identifiés des composés nucléotidiques de nature pyrimidique ne pouvant être confondus avec les acides cytidylique et uridylique jusqu'à présent mis en évidence. Voici, tels qu'ils peuvent être dégagés des résultats obtenus, les traits essentiels marquant la dégradation autolytique de l'ARN sous l'influence de divers effecteurs d'enzymes.

— Avec des composés tels que le cyanure ou l'iodacétate, on provoque une accumulation très importante des 4 ribomononucléotides de l'ARN, leur concentration à l'état libre pouvant atteindre pratiquement celle qu'ils représentent respectivement à l'état polymérisé dans l'ARN intact.

— La formation des 4 nucléosides au cours de la dégradation est particulièrement nette avec le nitrure pour l'adénosine, avec le fluorure pour la guanosine, les ions Co^{++} et les antibiotiques pour la cytidine, l'arséniate et les ions Co^{++} pour l'uridine. De même que l'inhibition thermique, l'action de composés tels que les antibiotiques, le cetavlon ou les ions Mn^{++}, favorise l'accumulation des 2 nucléosides désaminés de l'adénosine et de la guanosine : l'inosine et la xanthosine.

— La libération d'adénine, de guanine, des bases désaminées correspondantes ainsi que de l'uracile n'appelle pas de remarques particulières, puisque en tant que produits terminaux de la dégradation, nous avons vu qu'ils étaient dans tous les cas aisément décelables. Par contre, l'accumulation de cytosine libre, nulle dans l'autolyse spontanée et très faible après inhibition thermique, est démontrée une nouvelle fois dans plusieurs cas et de façon particulièrement nette sous l'influence des ions Mn^{++}.

— C'est en présence d'iodacétate, de nitrure, ainsi que des 3 antibiotiques utilisés que l'on assiste à une accumulation de nucléotides pyrimidiques de structure différente des uridine et cytidine 3' phosphates identifiés au cours des expériences antérieures. Leur identité a pu être établie en fonction de leurs caractéristiques chromatographiques et analytiques déterminées dans les mêmes conditions que celles décrites antérieurement pour les nucléotides préexistants des levures non autolysées.

Il apparaît que les nucléotides ainsi libérés sont des dérivés phosphorylés de l'uridine et de la cytidine où l'acide phosphorique estérifie l'hydroxyle en position 5' du ribose ; ils s'apparentent donc ainsi directement aux nucléotides libres acido-solubles présents dans les cellules

intactes. Le fait que leur concentration dans les extraits cellulaires après autolyse est manifestement supérieure à leur concentration initiale dans les mêmes extraits avant autolyse, montre que ces composés nucléotidiques ont bien l'ARN pour origine. C'est ainsi qu'à côté des bases, des nucléosides et des nucléotides 3' P déjà mis en évidence à plusieurs reprises on observe la présence de cytidine et d'uridine diphosphate (CDP, UDP) après action de l'iodacétate, tandis que l'uridine diphosphate acétylglucose amine (UDPAG) s'accumule dans les autolysats obtenus en présence de nitrure, d'auréomycine, de streptomycine et de pénicilline.

On observe enfin que l'action du bromure de cétyltriméthylammonium (cetavlon) au cours des phénomènes d'autolyse se traduit par une accumulation sensible d'acide orotique. Les concentrations déterminées dans ces conditions (4,3 µM/g levure poids sec) sont en effet notablement supérieures à celles présentes dans les extraits acido-solubles des levures non autolysées (1,02 µM/g levure poids sec) (1).

En résumé, la dégradation autolytique de l'ARN de levure comporte une suite d'actions enzymatiques dont l'inhibition partielle ou totale, à des stades divers sous l'influence de certains composés chimiques ou biologiques, peut provoquer l'accumulation des composés intermédiaires suivants :

— Les 4 ribonucléotides puriques et pyrimidiques dans la molécule desquels l'acide phosphorique estérifie l'hydroxyle en position 3' du ribose.

— Des composés nucléotidiques de nature pyrimidique dérivés des uridine et cytidine phosphates ou l'acide phosphorique estérifie l'hydroxyle fixé sur le carbone 5 du ribose.

— Les 4 nucléosides puriques et pyrimidiques correspondant aux 4 nucléotides précédents ainsi que les 2 nucléosides puriques dérivant de l'adénosine et de la guanosine par désamination : inosine et xanthosine.

— Les 4 bases constituantes adénine, guanine, cytosine et uracile et les 2 bases puriques désaminées hypoxanthine et xanthine dont toutes, à l'exception de la cytosine, constituent les produits essentiels de la dégradation par autolyse spontanée.

Il convient de remarquer que, dans aucune des conditions expérimentales utilisées, l'analyse chromatographique n'a révélé la présence des dérivés désaminés des nucléotides puriques : les acides inosique et xanthylique. D'autre part, les bilans quantitatifs concernant à la fois les fractions cellulaires dégradées et non dégradées ne font en aucun cas ressortir la présence d'un excès d'acide uridylique permettant de conclure à une désamination partielle de l'acide cytidylique.

(1) Les photographies c et d (planche A) illustrent l'aspect des chromatogrammes obtenus après séparation bidimensionnelle des composés accumulés dans le milieu sous l'influence du cetavlon (photo c) et des antibiotiques (photo d).

B. — Sensibilité des enzymes du catabolisme ribonucléique aux effecteurs.

Du fait même qu'elle permet l'identification des composés intermédiaires accumulés, l'étude de la dégradation autolytique de l'ARN de levure en présence d'effecteurs permet de définir la nature des systèmes enzymatiques qui participent à cette dégradation en même temps que leur sensibilité aux divers agents chimiques et biologiques utilisés. Dans une certaine mesure, le degré d'inhibition du système enzymatique affecté se traduira par l'importance quantitative du substrat ayant échappé à l'action de l'enzyme.

Activité ribonucléasique.

Si on appelle ribonucléase le complexe enzymatique effectuant la dégradation de l'ARN polymérisé jusqu'au stade mononucléotide, on concluera à une inhibition partielle ou totale de l'activité ribonucléasique là où, après autolyse, subsistera une fraction ribonucléique résiduelle.

Dans nos conditions expérimentales, l'activité ribonucléasique des cellules de levure est inhibée totalement par 2 métaux lourds *Ag* et *Hg* et par 2 réducteurs *formol* et *cystéine* ainsi qu'en témoigne la composition de la fraction nucléique résiduelle après un séjour prolongé des cellules à 37°C, cette composition étant exactement identique à celle de l'ARN polymérisé initial. Les résultats obtenus montrent encore qu'un autre métal lourd *Cu* ainsi que le *sulfure* et *l'arséniate* exercent également vis-à-vis de l'activité ribonucléasique une action inhibitrice importante puisque la fraction non dégradée renferme entre 30 et 80 p. 100 de chacun des nucléotides de l'ARN. Bien que moindre, l'action inhibitrice du *cyanure* et du *fluorure*, demeure encore sensible. Enfin l'activité ribonucléasique des cellules est encore légèrement affectée par les 3 *antibiotiques*, le *cetavlon* et le *2-4 dinitrophénol*.

Aucune inhibition n'est mise en évidence dans le cas de l'iodacétate, du nitrure de l'arsénite et des ions Co^{++} et Mn^{++}.

Nucléotidases.

Si l'on considère l'accumulation de mononucléotides libres comme le résultat d'une inhibition du ou des enzymes pouvant effectuer leur déphosphorylation, on peut conclure que la totalité des effecteurs utilisés, à l'exception toutefois de l'arséniate, des ions Mn^{++} et de ceux ayant bloqué totalement l'activité ribonucléasique (Ag^{+}, Hg^{++}, formol, cystéine) sont des inhibiteurs de nucléotidases. S'exerçant à des degrés divers selon

le composé, il semble que cette inhibition puisse dans plusieurs cas intéresser plus spécifiquement certains nucléotides.

C'est ainsi que les *ions* Cu^{++}, l'*iodacétate* et le *cyanure* semblent inhiber quasi totalement la déphosphorylation des nucléotides puriques et pyrimidiques. Le *sulfure*, le *fluorure* et le *nitrure* se montrent également actifs sans exercer toutefois une inhibition totale ainsi qu'en témoigne la présence des nucléosides correspondants.

Si on examine d'autre part les composés accumulés par les cellules en présence d'*arsénite*, on constate que les mononucléotides puriques ont été déphosphorylés alors qu'une fraction importante des acides cytidylique et uridylique a échappé à l'action des nucléotidases. Inversement, les *ions* Co^{++} inhiberaient spécifiquement la déphosphorylation de l'acide guanylique puisque c'est le seul des 4 nucléotides qui se soit accumulé dans le milieu. De même le *2-4 dinitrophénol* serait sans action sur la déphosphorylation de l'acide adénylique, mais bloquerait en partie les nucléotidases scindant les autres mononucléotides.

L'action inhibitrice que manifestent les *antibiotiques* vis-à-vis des nucléotidases semble s'exercer également à des degrés divers si l'on considère l'importance quantitative respective des nucléotides accumulés. Il apparaît que les antibiotiques inhibent de façon plus marquée la déphosphorylation des acides guanylique et uridylique que celle des acides adénylique et cytidylique sans qu'intervienne d'ailleurs la nature de l'antibiotique ; les concentrations respectives des mononucléotides libres sont en effet sensiblement identiques, qu'il s'agisse de l'auréomycine, de la pénicilline ou de la streptomycine. Le *cetavlon* se comporte également comme un inhibiteur de nucléotidases, son action portant plus particulièrement sur la déphosphorylation enzymatique de l'acide uridylique. Par contre, le rôle d'inhibiteur attribué classiquement à l'arséniate dans la phosphorylation des nucléosides (105) ou la déphosphorylation des nucléotides (59) n'est pas mis en évidence dans nos essais bien que ce composé ralentisse de façon notable l'activité ribonucléasique des cellules.

Tous les nucléotides dont l'accumulation a pu être mise en évidence dans diverses conditions d'inhibition étant des nucléosides 3' phosphates, l'action inhibitrice des divers composés qui viennent d'être énumérés s'est donc exercée à des degrés divers sur des phosphomonoestérases pouvant rompre spécifiquement la liaison esther-phosphate intéressant le carbone 3 du ribose.

De la même façon, les effecteurs tels que le nitrure, l'iodacétate et les antibiotiques ayant déterminé une accumulation de nucléotides pyrimidiques apparentés aux nucléosides 5' phosphates, inhibent une autre catégorie de nucléotidases rompant spécifiquement les liaisons ester-phosphate en 5'.

Nucléosidases.

Si l'on en juge par l'accumulation des nucléosides, la plupart des effecteurs étudiés manifestent une action inhibitrice plus ou moins marquée à l'égard des nucléosidases. Si cette action est peu apparente en ce qui concerne les ions Cu^{++} le sulfure et l'iodacétate, elle devient manifeste avec le *fluorure* et le *nitrure* qui inhibent dans des proportions sensiblement équivalentes les nucléosidases puriques et pyrimidiques. En ce qui concerne les *antibiotiques*, le *cetavlon* et les *ions* Co^{++}, ce sont plus particulièrement les nucléosidases pyrimidiques qui sont affectées. En présence *d'ions* Co^{++} cette inhibition apparaît comme quasi totale puisque 90 p. 100 de l'acide cytidylique de l'ARN est accumulé à l'état de cytidine et que la totalité de l'acide uridylique se retrouve à l'état d'uridine.

On retrouve avec l'*arsénite* et l'*arséniate* cette action inhibitrice spécifique déja observée avec d'autres effecteurs vis-à-vis des nucléotidases. Ces 2 composés sont manifestement sans action sur les nucléosidases puriques mais inhibent les nucléosidases pyrimidiques, l'arséniate bloquant à l'état d'uridine 66 p. 100 de l'acide uridylique de l'ARN et à l'état de cytidine 11 p. 100 seulement de l'acide cytidylique.

Enfin la présence des 2 nucléosides puriques désaminés inosine et xanthosine est l'indice que les nucléosidases correspondantes ont été partiellement inhibées, l'enzyme scindant l'inosine sous l'influence des antibiotiques et du cetavlon, celui concernant la xanthosine par action de la streptomycine, de la pénicilline, du composé d'ammonium quaternaire et des ions Mn^{++}.

Désaminases.

Désamination des nucléosides.

La dégradation des 2 nucléosides puriques et de la cytidine peut théoriquement s'effectuer selon 2 mécanismes enzymatiques distincts : soit par rupture directe de la liaison osidique sous l'action de nucléosidases, soit par désamination préalable du nucléoside suivie d'une libération de la base désaminée correspondante par intervention d'autres nucléosidases. L'accumulation d'adénosine, de guanosine et de cytidine dans le milieu peut donc résulter d'une inhibition de l'un ou l'autre de ces mécanismes enzymatiques soit des deux à la fois. Il n'est donc pas possible, en fonction des résultats obtenus, de préciser si les effecteurs déterminant une accumulation des 3 nucléosides affectent à la fois les nucléosidases et les désaminases éventuellement en jeu. Toutefois si l'on considère les seuls cas où la fraction désaminée de la cytidine a pu être estimée à partir de l'excès d'uridine, on peut admettre que le *nitrure* et les *ions* Co^{++} constituent 2 inhibiteurs efficaces de l'enzyme désaminant la cytidine.

Désamination des bases.

— Seule des 4 bases de l'ARN à ne pouvoir être identifiée au cours de l'autolyse spontanée des cellules, la cytosine parvient à s'accumuler dans le milieu sous l'influence de certains effecteurs. Ainsi le *2-4 dinitrophénol*, les *ions* Co^{++}, le *cetavlon*, et les *antibiotiques* exercent vis-à-vis de l'enzyme désaminant la cytosine une action inhibitrice plus ou moins marquée mais réelle. Mais c'est particulièrement aux *ions* Mn^{++} que la désaminase se révèle le plus sensible à en juger par les quantités importantes de cytosine accumulée dans le milieu.

— La présence de xanthine et d'hypoxanthine aux côtés de la guanine et de l'adénine au cours de l'autolyse spontanée des cellules est l'indice de l'intervention de désaminases.

Si on prend comme test d'inhibition de l'enzyme désaminant l'adénine, l'absence d'hypoxanthine dans le milieu on constate, compte tenu des proportions respectives d'adénine et d'hypoxanthine libérées dans le même temps par la suspension témoin, que l'adénase est fortement inhibée par les *ions* Mn^{++}, les *antibiotiques* et le *cetavlon* ainsi que l'*arséniate* et le *nitrure*.

De même en se basant sur les quantités de xanthine libérées ou non par rapport à la suspension témoin, on constate que l'enzyme responsable de la désamination de la guanine apparaît insensible à l'action de la plupart des composés utilisés, à l'exception du *2-4 dinitrophénol* et du *nitrure*.

Catabolisme du ribose.

Les résultats obtenus mettent en évidence que le catabolisme du ribose est perturbé dans de nombreux cas, exception faite des effecteurs agissant au premier stade de la dégradation en bloquant l'activité ribonucléasique des cellules.

Si l'on compare la teneur en ribose des autolysats obtenus dans diverses conditions après une incubation de 10 jours à 37°C à celle des cellules non autolysées, on constate que cette teneur a diminué de moitié pour la suspension témoin alors qu'elle a presque doublé sous l'influence des ions Cu^{++} et de l'arséniate et plus que quintuplé avec les antibiotiques. Cette accumulation du ribose, déterminée par la plupart des composés utilisés à l'exception du 2-4 dinitrophénol, constitue un autre aspect de l'inhibition plus ou moins marquée des nucléotidases et des nucléosidases participant au catabolisme de l'ARN. Il s'agit de ribose lié lorsque l'effecteur inhibe l'action de ces enzymes en provoquant une accumulation de nucléotides et de nucléosides dans le milieu et l'on sait que seul le ribose d'origine purique est dosé dans ces conditions : c'est ce qui peut être observé avec les *ions* Cu^{++}, les *ions* Co^{++}, le *cyanure*, l'*iodacétate* et le *nitrure*. Il s'agit au contraire de ribose libre lorsque les composés intermédiaires

ne sont ni des nucléotides ni des nucléosides : c'est ce qui a lieu avec l'*arsénite*, l'*arséniate* et les *ions* Mn^{++}. Avec le *composé d'ammonium quaternaire* et les *antibiotiques*, où l'on atteint aux concentrations les plus élevées, c'est vraisemblablement la forme libre qui prédomine.

Nos conclusions concernant cet aspect particulier du catabolisme ribonucléique chez la levure rejoignent diverses observations intéressant le catabolisme des pentoses chez certains autres microorganismes. On a signalé par exemple que l'arséniate inhibait le catabolisme des pentoses chez *E. coli* (176). On a cité d'autre part 2 cas où les antibiotiques ont également une action inhibitrice : la pénicilline chez *S. aureus* (142) et la streptomycine chez *Clostridium sporogenes* (117).

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Les résultats qui ont été obtenus soit en laissant les levures s'autolyser spontanément, soit en modifiant les activités enzymatiques, permettent de préciser la nature et le mode d'action des diverses nucléases participant au catabolisme et d'indiquer en conséquence les étapes successives marquant cette dégradation autolytique de l'acide ribonucléique.

Nous examinerons toutefois en premier lieu, à la lumière des observations effectuées sur d'autres microorganismes et de nos résultats personnels, l'action particulière exercée par les antibiotiques sur les enzymes du catabolisme ribonucléique.

I. — ACTION DES ANTIBIOTIQUES SUR LES NUCLÉASES DES LEVURES

Aucun travail n'a jusqu'à présent fait état de l'action exercée par les antibiotiques sur les nucléases des levures mais un certain nombre d'études ont été entreprises en vue de préciser leur influence sur le catabolisme ribonucléique de divers microorganismes.

L'antibiotique le plus étudié, la pénicilline, est reconnu comme apportant de profondes perturbations au métabolisme de l'ARN chez les bactéries. Gros et Macheboeuf (94) ont montré qu'elle déterminait un ralentissement très sensible de la dégradation de l'ARN au cours de l'autolyse de *Cl. sporogenes*. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que l'antibiotique détruisait la ribonucléo-dépolymérase, et qu'en inhibant ainsi la dégradation des polynucléotides, le catabolisme nucléique se trouvait arrêté dès les premiers stades (90-184). Mais d'autres ont montré au contraire que l'activité ribonucléasique n'était pas affectée par la pénicilline (95-136).

Mêmes conclusions divergentes dans le cas de la streptomycine, les uns admettant qu'elle active la ribonucléase des bactéries (47), les autres lui attribuant au contraire un rôle inhibiteur (44-117). MACHEBOEUF et coll. (93) sont d'avis que l'essentiel des perturbations provoquées par la pénicilline dans le catabolisme ribonucléique chez *S. aureus* affecte principalement, en même temps que la guanosine nucléosidase, la déphosphorylation de l'acide guanylique sans que celle des 3 autres ribomononucléotides soit modifiée. D'après les mêmes auteurs (93-149), la streptomycine n'exerce aucune action inhibitrice à l'égard des nucléotidases de *S. albus* et, contrairement à la pénicilline, n'affecte pas davantage la dégradation de l'acide guanylique chez *S. aureus*. D'autres observations expérimentales ont d'ailleurs conclu dans le même sens et voient dans les antibiotiques des inhibiteurs de phosphatases. C'est l'avis émis par PRATT et DUFRENOY (82-208) en ce qui concerne la pénicilline ; c'est également l'avis de divers auteurs (58-168-208) dans le cas de la streptomycine, laquelle inhibe profondément la dégradation des mononucléotides chez *Clostridium*.

Cette action inhibitrice des nucléotidases attribuée à la pénicilline semble devoir présenter certaines analogies avec d'autres observations actuellement bien connues des biochimistes faisant état d'une action très particulière de l'antibiotique sur les cellules de microorganismes. C'est en effet en 1949 que PARK et JOHNSON (203) puis MITCHELL et coll. (188-190) signalent pour la première fois que *S. aureus* en présence de pénicilline accumule des quantités anormalement élevées de nucléotides libres. Un peu plus tard PARK (202) devait identifier 3 substances à structure nucléotidique ayant comme constituant fondamental l'uridine 5' pyrophosphate (UDP). Plus récemment STROMINGER (244) a pu lui-même identifier un autre nucléotide, le cytidine 5' monophosphate (CM_5P) dans des extraits de *S. aureus* soumis à l'action de la pénicilline.

Or, nous avons vu que les cellules de levure abandonnées à l'autolyse en présence de pénicilline libèrent des quantités notables d'uridine diphosphate-acétyl-glucose-amine (UDPAG), de structure analogue à celle des dérivés de l'uridine 5' pyrophosphate identifiés par PARK chez *S. aureus*, les mêmes constatations étant faites d'ailleurs aussi bien avec l'auréomycine et la streptomycine. L'accumulation de tels nucléotides témoigne d'une inhibition par l'antibiotique de nucléotidases 5' spécifiques. Il est donc rationnel d'admettre que la pénicilline et les antibiotiques exercent sur les cellules de levures une action analogue à celle constatée antérieurement sur *S. aureus* se traduisant par une libération de dérivés phosphorylés de l'uridine.

Mais cette mise en liberté de nucléotides à des « concentrations anormalement élevées » pose du même coup la question de leur origine. Or nos résultats montrent que les concentrations des nucléotides ainsi libérés

sont de beaucoup supérieures aux concentrations des mêmes nucléotides préexistants dans les levures fraîches non traitées, et qu'en conséquence ils sont d'origine ribonucléique. Nous avons d'ailleurs indiqué précédemment que les cellules de levure soumises à l'action du nitrure libéraient, au même titre que les antibiotiques, des quantités notables d'UD PAG alors que l'iodacétate provoquait l'accumulation de CDP et UDP.

L'action des antibiotiques sur les enzymes du catabolisme ribonucléique chez les levures ne se limite d'ailleurs pas à une inhibition des 5' nucléotidases. Les résultats obtenus mettent en évidence que l'auréomycine, la pénicilline et la streptomycine perturbent la dégradation de l'ARN dès les premiers stades si l'on en juge par la présence, après 10 jours d'incubation à 37°C, d'un résidu ribonucléique témoignant d'une inhibition sans doute partielle mais évidente de l'activité ribonucléasique des cellules.

Mais ce sont principalement les nucléotidases et les nucléosidases qui voient leur activité fortement modifiée sous l'influence des antibiotiques. La présence des 4 ribomononucléotides parmi les produits de dégradation indique qu'il y a inhibition des nucléotidases effectuant spécifiquement la déphosphorylation des nucléotides 3' P ; cette inhibition s'exerce d'ailleurs plus particulièrement vis-à-vis des nucléotidases de l'acide uridylique et de l'acide guanylique. D'autre part, les concentrations en nucléosides accumulés montrent que les nucléosidases puriques sont affectées dans des proportions moindres que les nucléosidases pyrimidiques. Enfin, l'accumulation de cytosine et l'absence d'hypoxanthine dans les autolysats soumis à l'influence des antibiotiques témoigne que leur action inhibitrice s'exerce également sur la cytosine désaminase et l'adénase.

En résumé, il apparaît que les antibiotiques exercent sur le catabolisme ribonucléique des levures une action inhibitrice affectant à des degrés divers l'ensemble des systèmes enzymatiques qui y participent, depuis le complexe ribonucléasique jusqu'aux désaminases de la cytosine et de l'adénine en passant par les nucléotidases et les nucléosidases. L'inhibition concerne plus particulièrement les nucléotidases 5' des dérivés de l'uridine 5' phosphate, les nucléotidases 3' des acides uridylique et guanylique, les cytidine et uridine nucléosidases.

Ces conclusions rejoignent dans une certaine mesure celles exposées précédemment quant à l'action inhibitrice de la pénicilline ou de la streptomycine vis-à-vis de la ribonucléase et des nucléotidases de certains microorganismes. Elles diffèrent cependant des résultats obtenus par MACHEBOEUF et coll. sur *S. aureus* en ce sens que la nucléotidase de l'acide guanylique n'est pas la seule affectée ; rien ne fait ressortir d'autre part une inhibition particulière de la guanosine-nucléosidase puisqu'au contraire l'inhibition porte principalement sur les nucléosidases pyrimi-

diques. Il est enfin intéressant de noter que les 3 antibiotiques étudiés se comportent de façon sensiblement analogue et que leurs propriétés d'inhibition apparaissent indépendantes de leur origine biologique.

II. — LES NUCLÉASES DES LEVURES

Nous avons précédemment fait mention des travaux ayant eu pour objet l'étude de la dégradation de l'ARN de levure « in vitro » à l'aide de préparations enzymatiques isolées des sources biologiques les plus diverses ; nous avons d'autre part fait état d'observations concluant à la présence chez les levures de nucléosidases et désaminases ainsi que des hypothèses émises sur la nature des systèmes enzymatiques participant au catabolisme des bases puriques et pyrimidiques (cf. tableau IV). Nous allons examiner en quel sens nos propres résultats permettent de préciser les caractéristiques des nucléases des levures et de donner une vue d'ensemble de leur mode d'action aux étapes successives marquant la dégradation autolytique de l'ARN.

Nous étudierons donc successivement le complexe ribonucléasique, les nucléotidases, les nucléosidases, les désaminases ainsi que les mécanismes enzymatiques susceptibles d'intervenir dans le catabolisme des bases puriques et pyrimidiques.

A. — Activité ribonucléasique.

1. — Sensibilité aux effecteurs.

Les constatations que nous avons faites sur la sensibilité aux effecteurs du complexe ribonucléasique des cellules de levure appellent plusieurs remarques si on les compare à celles effectuées « in vitro » en soumettant l'ARN de levure isolé à l'activité ARNase de diverses préparations enzymatiques.

a) Métaux :

Nous retrouvons en ce qui concerne Ag^{+}, Hg^{++} et Cu^{++} l'action inhibitrice de ces métaux signalés par plusieurs auteurs dans le cas de la ribonucléase pancréatique (65-278) ou du venin de serpent (249). Ce rôle inhibiteur des ions Ag^{+} sur la dégradation de l'ARN de levure vient confirmer une observation antérieure de Strain (242) selon laquelle le nitrate d'argent 0,005 M inhibe de façon marquée la dégradation protéique dans l'autolyse des levures. L'action négligeable des ions Mn^{++} constatée dans nos essais s'accorde également avec plusieurs observations effectuées « in vitro » (13-191-278) bien que d'autres auteurs attribuent à

Mn un rôle inhibiteur (148) ou activateur (249). Par contre, on ne retrouve pas l'action inhibitrice, d'ailleurs peu marquée, du cobalt signalée par MIURA et NAKAMURA (191).

b) Réducteurs.

L'action fortement inhibitrice des réducteurs utilisés : formol, sulfure et cystéine vérifie, en ce qui concerne l'aldéhyde formique, une observation ancienne de NAVASSART (193) signalant que l'excrétion des bases puriques au cours de l'autolyse des levures était supprimée par le formol 1 p. 100. TABORDA et coll. (249) ont également conclu à une inhibition marquée de l'activité ribonucléasique du venin de serpent par le formol et la cystéine. Mais ce rôle inhibiteur des réducteurs n'est pas unanimement admis puisque d'aucuns les considèrent comme étant sans action particulière (65) alors que d'autres voient en eux des activateurs (152).

c) Autres effecteurs.

L'inhibition à des degrés divers de l'activité ribonucléasique des cellules de levure par l'arséniate, le fluorure et le cyanure s'accorde avec l'action manifestée par ces mêmes composés sur l'activité ARNase du venin de serpent (249), bien que le cyanure ait été considéré comme activateur (152) ; nos résultats n'indiquent pas par contre que l'iodacétate, le nitrure et l'arsénite, considérés à plusieurs reprises comme inhibiteurs, se comportent de la même façon à l'égard de l'ARNase des levures.

Bien que peu marquée, l'action inhibitrice du 2-4 dinitrophénol mise en évidence est à rapprocher du même rôle attribué à ce composé vis-à-vis de l'activité ribonucléasique du foie d'oiseau (81). Par contre nos résultats ne confirment aucunement les observations récentes de VOSTI et JOSLYN (263) selon lesquelles l'autolyse des levures est fortement activée par le 2-4 dinitrophénol ainsi que, à un degré moindre, par l'arséniate, le fluorure, le cyanure et le nitrure.

Par ailleurs, aucun travail n'a fait mention de l'inhibition de l'activité ribonucléasique par le bromure de cétyltriméthylammonium.

Notons enfin que la dégradation partielle subie par les cellules incubées en présence de cuivre, de sulfure ou d'arséniate, n'a apporté aucune modification sensible dans les proportions moléculaires des nucléotides constituant la fraction ribonucléique résiduelle, le rapport purines/pyrimidines restant très voisin de celui déterminé sur les cellules intactes. Par contre, dans le cas du cyanure, du fluorure et du cétavlon, la fraction résiduelle présente un rapport purines/pyrimidines élevé témoignant que la dégradation s'est effectuée avec libération préférentielle de constituants pyrimidiques.

2. — Nature et mode d'action du complexe ribonucléasique.

L'activité ribonucléasique des cellules de levure se traduit par la mise en liberté de 2 types distincts de mononucléotides : les uns de nature pyrimidique sont des nucléoside 5' diphosphates dérivés de l'uridine ou de la cytidine, les autres, appelés respectivement acides adénylique, guanylique, cytidylique et uridylique sont considérés comme des nucléosides 3' phosphates.

Cette libération, au cours de la dégradation de l'ARN, de nucléotides à structure différente implique l'intervention de 2 systèmes enzymatiques distincts.

Les plus récents travaux sur la structure de l'acide ribonucléique de levure ont en effet établi que les nucléotides constituant les chaînes polynucléotidiques étaient liés entre eux par des liaisons phosphodiester intéressant le carbone 5 du ribose d'un nucléotide et le carbone 3 du ribose du nucléotide voisin. La présence de 2 types de mononucléotides parmi les produits de dégradation autolytique de l'ARN suppose que le complexe ribonucléasique des levures comporte, entre autres nucléases, 2 groupes distincts de phosphodiestérases : l'un (type A) scindant les liaisons diester n'intéressant pas le carbone 5 et libérant ainsi des nucléosides 5'-diphosphates, l'autre (type B) rompant au contraire les liaisons en C_5 et donnant naissance à des nucléotides où l'estérification intéresse le C_3 du ribose. Il est vraisemblable d'ailleurs que l'action de ces phosphodiestérases est précédée d'une dépolymérisation préalable de la molécule d'ARN, mais les résultats obtenus ne nous autorisent ni à affirmer ni à infirmer l'intervention d'enzymes pouvant libérer des oligonucléotides.

Il convient toutefois d'apporter certaines réserves au raisonnement précédent. A plusieurs reprises en effet, Brawerman et Chargaff (30) ont attiré l'attention sur l'importance de certains enzymes cellulaires catalysant la phosphorylation des nucléosides par transfert de PO_4H_3 à partir de phosphates organiques. Cette action des nucléoside-phosphotransférases peut donner naissance soit à des nucléosides 5' phosphates (plantes et bactéries) soit à des nucléosides 3' phosphates (tissus animaux) et est prépondérante dans les processus généraux de la biosynthèse des nucléotides.

Il n'a pas été fait mention de l'existence de tels enzymes chez les levures ; on n'a pas signalé davantage que des nucléosides 5' diphosphates puissent être synthétisés par cette voie. Mais il n'est pas interdit d'admettre que des réactions de transphosphorylation analogues à celles décrites par Kornberg et coll. (157 bis), venant compléter l'action des nucléoside phosphotransférases, puissent donner naissance à des composés de même structure. Aussi notre interprétation sur l'accumulation de nucléosides 3' phosphates et 5' diphosphates dans certaines conditions

d'autolyse n'est-elle valable que dans la mesure où, dans nos conditions expérimentales, il n'y a pas eu intervention d'enzymes du type de ceux dont il vient d'être fait état.

Compte tenu de ces observations, il semble que l'action des phosphodiestérases du type A doive précéder celle des mêmes enzymes du type B. La mise en liberté de nucléosides 5' diphosphates pyrimidiques dans les premiers stades de la dégradation pourrait peut-être rendre compte du léger accroissement du rapport purines/pyrimidines de la fraction ribonucléique résiduelle dans l'autolyse spontanée, bien que la teneur de cette fraction en nucléotides puriques accuse également une très légère baisse. Dans les mêmes conditions, l'apparition à l'état libre des acides adénylique, guanylique, cytidilique et uridylique n'a lieu qu'au 5^{e} jour et succède à une chute brutale de leurs concentrations respectives dans la fraction non dégradée.

a) Libération de nucléosides pyrimidiques 5' diphosphates.

Les proportions de cytidine ou d'uridine 5' diphosphates accumulés dans le milieu sous l'influence de l'iodacétate, du nitrure ou des antibiotiques représentent, selon les cas, entre 7,7 et 17,9 p. 100 du nucléotide pyrimidique correspondant dans l'ARN polymérisé. Nous avons montré d'autre part (cf. tableau XVIII) que les proportions moléculaires de la cytosine et de l'uracile ribonucléiques étaient chez la levure 1 respectivement de 0,77 et 1,02 pour un total théorique de 4 molécules.

Si, entre les divers effecteurs utilisés, on considère les concentrations maxima des nucléosides 5' diphosphates accumulés (cas de l'iodacétate) on trouve, pour un total de 4 molécules, qu'il apparaît respectivement 0,175 et 0,165 molécules d'uridine et de cytidine 5'-diphosphates, soit 4,5 et 4,1 p. 100 des nucléotides totaux de l'ARN. Les groupements pyrimidiques des chaînes polynucléotidiques pouvant donner naissance à de tels nucléotides constitueraient donc une fraction très réduite des nucléotides de l'ARN ; ceci expliquerait alors pourquoi, contrairement aux acides adénylique, guanylique, cytidylique et uridylique, les nucléosides 5'-diphosphates ne sont pas décelés dans l'autolyse spontanée des cellules. En bref, le rôle des phosphodiestérases du type A ne représenterait qu'une faible part de l'activité ribonucléasique, l'essentiel de cette activité revenant aux phosphodiestérases du type B.

Il reste à expliquer le mode de fixation sur la chaîne polynucléotidique de ces nucléosides pyrimidiques 5'-diphosphates dont la molécule peut être liée en outre à un reste gluco-aminé. Deux possibilités peuvent être envisagées : ou bien ils se trouvent sur cette chaîne en position terminale, ou bien ils sont fixés latéralement.

La première hypothèse ne permet pas de rendre compte de la faible

proportion de nucléosides 5' diphosphates libérés par rapport aux nucléosides 3' phosphates, quelle que soit la position du P terminal monoestérifié. MARKHAM et coll. (181) ont en effet admis l'existence de 2 types d'ARN selon que le P terminal monoestérifié est fixé sur le C_3 ou le C_5 du ribose Or, si l'on admet que la structure de l'ARN de levure est telle que le P terminal est en position 3 l'action des phosphodiestérases rompant la liaison en 5' se traduirait par une libération exclusive de nucléosides 3' P. Si cette fixation du P terminal intéresse au contraire le C_5 du ribose, le nucléotide occupant l'extrémité de la chaîne serait un nucléoside 3'-5' diphosphate ne contenant pas de groupement pyrophosphorique.

Si on envisage d'autre part que les nucléosides 5' diphosphates sont fixés latéralement sur la chaîne polynucléotidique 2 modes de fixation sont possibles : ou bien la liaison intéresse le P d'un nucléotide de la chaîne principale ou bien elle s'effectue par l'intermédiaire d'un hydroxyle libre du ribose, de telle sorte que le groupement phosphodiester unisse le C_2 d'un nucléotide de la chaîne principale à un autre carbone du premier reste nucléotide de la chaîne latérale.

Le premier mode de fixation, qui donne lieu à la formation d'un groupement phosphotriester a été envisagé par FLETCHER et coll. (88), mais il ne peut rendre compte de la formation de nucléosides 5' diphosphates. La fixation sur le ribose a été proposée par ANDERSON et coll. (8) à la suite d'études faisant intervenir la méthylation de l'ARN de levure. COHN et VOLKIN (60) ont d'autre part envisagé l'existence de chaînes latérales de ce type en isolant d'hydrolysats d'ARN de levure par la diestérase du venin de serpent des nucléosides pyrimidiques 2'-5' et 3'-5' diphosphates. Un tel mode de fixation permettrait d'expliquer les proportions respectives de nucléosides 5' diphosphates et de nucléosides 3' phosphates libérés dans la dégradation autolytique de l'ARN par action des phosphodiestérases A (<—>) et B (<—>) correspondantes.

La Figure 9 indique schématiquement comment pourrait se concevoir la fixation latérale des nucléosides 5' diphosphates sur la chaîne polynucléotidique. La liaison diester s'effectuerait par l'intermédiaire du groupement pyrophosphorique en C_5 du nucléotide avec l'hydroxyle en C_2 du ribose d'un des nucléotides de la chaîne principale. Le P pyrophosphorique formant la liaison pourrait éventuellement, par son 3e groupement acide libre, être relié à un reste gluco-aminé. Bien que ce type de liaison n'ait pas été mis en évidence dans l'ARN de levure, une telle structure comporterait alors un P triesterifié et les phosphoestérases susceptibles de la rompre seraient en fait des phosphotriestérases.

On peut concevoir qu'une telle fixation des nucléosides pyrimidiques 5' diphosphates est plus labile que la liaison 3'-5' unissant les nucléotides de la chaîne principale. Si l'on admet qu'il en est ainsi, on expliquerait que leur mise en liberté lors de la dégradation de l'ARN puisse précéder

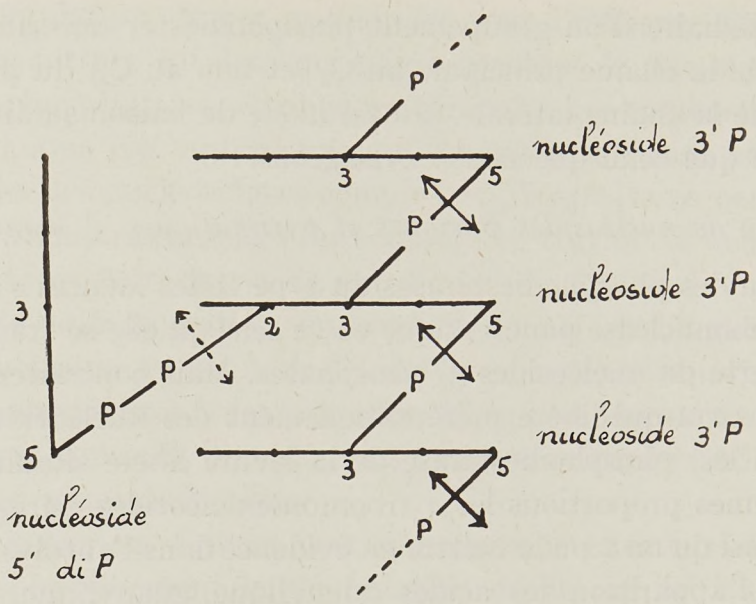


FIG. 9.

celle des nucléosides 3'P. On pourrait expliquer encore l'observation de TRUCCO (254) selon laquelle les quantités de UDPG libérées par la levure traitée au toluène sont plus élevées que celles préexistant normalement dans les cellules.

Il est d'ailleurs vraisemblable que des composés tels que le nitrure, l'iodacétate et les antibiotiques, outre l'action inhibitrice qu'ils exercent sur les systèmes enzymatiques eux-mêmes, auraient pour effet premier de rompre les liaisons labiles libérant ainsi les pyrimidine-phosphates. Cette hypothèse trouve, semble-t-il, un autre argument dans les expériences de PARK (201-202-203) sur *S. aureus* où l'accumulation dans le milieu des dérivés de l'UDP se manifeste 30 minutes seulement après la mise en contact avec la pénicilline. La présence, dans nos expériences sur les levures, de composés analogues après un séjour prolongé des autolysats à 37°C, témoigne qu'il y a eu en outre inhibition des enzymes capables de dégrader les nucléotides ainsi libérés. Enfin, la perte en nucléotides pyrimidiques observée au cours de la purification des préparations d'ARN, semble venir confirmer notre façon de voir.

Par ailleurs, le fait que la molécule d'ARN soit susceptible d'être en partie constituée de nucléotides de structure analogue à ceux identifiés à l'état libre, semble venir à l'appui des hypothèses qui voient dans ces nucléotides préexistants les précurseurs de la biosynthèse ribonucléique. La labilité de tels groupements expliquerait qu'ils puissent donner lieu à des réactions d'échange réversibles entre les formes libres et l'ARN polymérisé.

COHN et VOLKIN (60) admettent pour leur part que la structure de l'ARN peut présenter des groupements latéraux plus importants constitués de plusieurs nucléotides associés. La liaison s'effectuerait dans ce cas

par l'intermédiaire d'un groupement phosphodiester unissant le C_2 d'un nucléotide de la chaîne principale au C_3 (et non au C_5) du premier reste nucléotide de la chaîne latérale. Un tel mode de liaison serait sans doute moins labile que celui que nous envisageons.

b) Libération de nucléosides puriques et pyrimidiques 3' monophosphates.

L'action des phosphodiestérases du type B des levures s'apparente à celle de la ribonucléase pancréatique en ce sens qu'elle se traduit par une mise en liberté de nucléosides 3' phosphates. Mais contrairement à l'enzyme de KUNITZ qui libère préférentiellement des nucléotides pyrimidiques, la (ou les) phosphodiestérase de la levure libère simultanément et dans les mêmes proportions les 4 ribomononucléotides puriques et pyrimidiques ainsi qu'on a pu le mettre en évidence dans l'autolyse spontanée. D'une part, l'apparition des acides adénylique, guanylique, cytidylique et uridylique libres se manifeste au même stade de la dégradation, d'autre part les proportions moléculaires des nucléotides correspondants de la fraction résiduelle demeurent constantes au cours de l'autolyse.

Aucun fait n'implique donc que tels groupements soient libérés de préférence à d'autres. La spécificité d'action de la ribonucléase du pancréas vis-à-vis de l'ARN de levure « in vitro » ne saurait donc être identifiée avec celle des systèmes enzymatiques cellulaires sur leur propre substrat. On possède d'ailleurs un certain nombre de faits expérimentaux montrant que les nucléases manifestent des spécificités différentes selon leur origine et qu'il ne saurait être question de concevoir un type unique de ribonucléase.

C'est ainsi que HOLDEN et PIRIE (110) ont montré que l'ARNase d'un extrait de feuilles dégrade l'ARN de levure à un stade plus avancé que la ribonucléase du pancréas ; or, les 2 enzymes se différencient par leur thermostabilité, leur sensibilité aux inhibiteurs et leur pH optimum d'activité ce dernier, compris entre 5 et 6 pour l'enzyme végétal, est de 7,7 pour l'enzyme animal (145). MAGASANICK et CHARGAFF (171) ont montré de même que l'ARN de levure est moins résistant à l'enzyme de KUNITZ que l'ARN du pancréas. Dans un autre domaine, ROTH (213) a mis en évidence la présence de 2 ribonucléases différentes dans la rate et dans le foie du rat.

B. — Nucléotidases.

La libération de mononucléotides à structure différente et leur déphosphorylation consécutive implique que les cellules de levures possèdent 2 types de phosphomonoestérases : des nucléotidases 5' déphosphorylant spécifiquement les nucléosides 5' phosphates après rupture de la liaison pyrophosphorique des diphosphates et des nucléotidases 3' scindant la molécule des nucléosides 3' phosphates.

L'accumulation de ces nucléotides sous l'influence du fluorure, du cyanure, du nitrure ou des ions cuivre confirme le rôle classique d'inhibiteurs de phosphatases attribué en général à ces composés.

Nous avons cité antérieurement l'hypothèse émise par KAY (127) qui considère les nucléotidases comme des phosphatases non spécifiques. Les observations rassemblées au cours de ce travail ne nous permettent pas de partager cette façon de voir.

L'étude de la libération, en fonction du pH, de l'o-phosphate d'origine ribonucléique au cours de l'autolyse spontanée nous a montré que les levures manifestent des activités phosphomonoestérases différentes et que divers types de phosphatases peuvent participer à la déphosphorylation des mononucléotides.

Nous avons vu d'autre part que certains effecteurs sont capables d'inhiber spécifiquement la dégradation de tel ou tel nucléotide sans affecter pour autant la déphosphorylation de ceux qui sont libérés simultanément. Cette différence de comportement de l'activité phosphomonoestérase des levures vis-à-vis des effecteurs implique que la dégradation des ribomononucléotides n'est pas déterminée par un seul type de nucléotidase, mais que plutôt chaque mononucléotide est déphosphorylé de façon spécifique. Ainsi, les cellules de levure contiendraient 4 nucléotidases 3' différentes pouvant rompre spécifiquement la liaison phosphomonoester des acides adénylique, guanylique, cytidylique et uridylique.

C. — Nucléosidases.

La sensibilité aux effecteurs des systèmes enzymatiques cellulaires capables de rompre la liaison osidique entre la base et le ribose, se traduisant par une accumulation plus ou moins marquée de tel ou tel nucléoside, est également l'indice de l'intervention de nucléosidases spécifiques.

La présence dans les autolysats, selon les effecteurs employés, d'adénosine, de guanosine, d'inosine et de xanthosine témoigne d'une inhibition des *nucléosidases puriques* correspondantes. Selon HEPPEL et HILMOE (105) le même enzyme dégraderait ces 4 nucléosides selon un processus hydrolytique ; la spécificité de cette nucléoside-hydrolase s'étendrait donc à tous les nucléosides puriques. Seules l'inosine et la guanosine pourraient être dégradées par un autre mécanisme enzymatique faisant intervenir la même nucléoside-phosphorylase.

L'accumulation de cytosine dans certaines conditions d'inhibition témoigne de l'intervention d'une *cytidine nucléosidase*. Enfin, les résultats obtenus confirment que l'uridine subit l'action d'une *uridine nucléosidase*, enzyme dont CARTER (42) a pour la première fois signalé la présence chez la levure et qui scinde le nucléoside par un simple mécanisme hydrolytique.

D. — Désaminases.

a) Nucléotides désaminases.

Nos résultats ne font pas apparaître que les cellules de levure possèdent un équipement enzymatique susceptible d'effectuer la désamination des ribomononucléotides. Ni au cours de l'autolyse spontanée, ni dans aucun cas d'inhibition, l'analyse chromatographique des extraits cellulaires n'a mis en évidence la présence des dérivés désaminés des acides adénylique et guanylique ; nous avons montré par ailleurs que les concentrations en acide uridylique libre ne permettaient dans aucun cas de conclure à une désamination éventuelle de l'acide cytidylique. Ces conclusions rejoignent en partie celles formulées par Di Carlo et coll. (72) concernant l'absence d'une désaminase de l'acide cytidylique chez *T. utilis*, mais ne confirment pas celles relatives à la présence chez la même levure d'une désaminase spécifique de l'acide adénylique.

Cette inaptitude des cellules de levure à désaminer les nucléotides ne concernerait toutefois que les nucléotides d'origine nucléique, car il semble que des nucléotides-désaminases interviennent dans la dégradation des nucléotides préexistants. Buchel et coll. (34) ont en effet mis indirectement en évidence la présence dans des autolysats de levure d'inosine triphosphate (ITP) résultant d'une désamination de l'ATP.

b) Nucléosides désaminases.

La dégradation des nucléosides par action des nucléosidases peut être précédée, du moins en ce qui concerne l'adénosine, la guanosine et la cytidine, de l'intervention de désaminases. L'accumulation de xanthosine et d'inosine sous l'influence de divers effecteurs témoigne que les cellules de levure possèdent effectivement des *guanosine et adénosine désaminases*.

Nos résultats confirment d'autre part les observations déjà signalées de Wang et coll. (264) sur la présence chez les levures d'une *cytidine désaminase*. En montrant de notre côté que les quantités d'uridine accumulées dans certaines conditions d'inhibition sont supérieures à celles correspondant à la totalité de l'acide uridylique de l'ARN, nous mettons en évidence qu'une cytidine désaminase intervient effectivement dans le catabolisme ribonucléique. Il est d'ailleurs vraisemblable, si l'on s'en rapporte aux quantités respectives de cytidine et de cytosine accumulées, que le mécanisme de dégradation du nucléoside consiste davantage en l'intervention de la désaminase que de la nucléosidase.

c) Désaminases des bases puriques et de la cytosine.

La présence simultanée d'adénine et d'hypoxanthine, de guanine et de xanthine dans les autolysats et la diminution progressive des concentrations en adénine et guanine au bénéfice de leurs dérivés désaminés ne laisse subsister aucun doute sur l'intervention d'enzymes désaminant respectivement l'adénine (*adénase*) et la guanine (*guanase*).

La désamination de la cytosine en uracile par intervention d'une cytosine désaminase spécifique (50-143), constitue sans doute d'autre part le mécanisme enzymatique le plus évident parmi ceux marquant les étapes successives du catabolisme ribonucléique. Si, à aucun stade de l'autolyse spontanée des cellules, la cytosine ne peut être caractérisée, on retrouve au terme de la dégradation la totalité de la base à l'état d'uracile libre. Par ailleurs, l'accumulation de cytosine sous l'action de certains effecteurs montre, par le fait même que l'enzyme effectuant sa désamination est inhibé, que cette base pyrimidique constitue bien une des étapes du catabolisme ribonucléique.

E. — Enzymes du catabolisme de l'hypoxanthine, de la xanthine et de l'uracile.

L'interprétation des résultats obtenus dans cette phase ultime de la dégradation cellulaire doit dans une certaine mesure tenir compte des actions enzymatiques secondaires résultant de la contamination des milieux à ce stade de l'autolyse. Il semble néanmoins que les phénomènes observés nous autorisent à donner certaines précisions sur les mécanismes enzymatiques par lesquels les cellules de levure sont susceptibles d'effectuer la dégradation de l'hypoxanthine et de la xanthine, les étapes marquant le catabolisme de l'uracile n'ayant pu être mises en évidence.

La composition quantitative en bases puriques des autolysats après dégradation totale de l'ARN serait l'indice que les levures possèdent un enzyme capable d'oxyder l'hypoxanthine en xanthine. L'intervention d'une *hypoxanthine-oxydase* serait particulièrement apparente dans le cas de la levure 12 (cf. tableau XX). Par ailleurs, la formation d'acide urique, d'allantoïne et, à des concentrations plus faibles, des acides allantoïque et glyoxylique au détriment de la xanthine, dont la levure 10 donne l'exemple le plus démonstratif, témoignerait de l'intervention successive d'une *xanthine-oxydase*, d'une *uricase*, d'une *allantoïnase* et d'une *allantoïcase*. Toutes les levures examinées semblent posséder l'équipement enzymatique permettant ces transformations successives. Mais certaines (*S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *S. carlsbergensis*) seraient capables d'effectuer cette dégradation beaucoup plus rapidement que d'autres (*S. cerevisiae* Hansen).

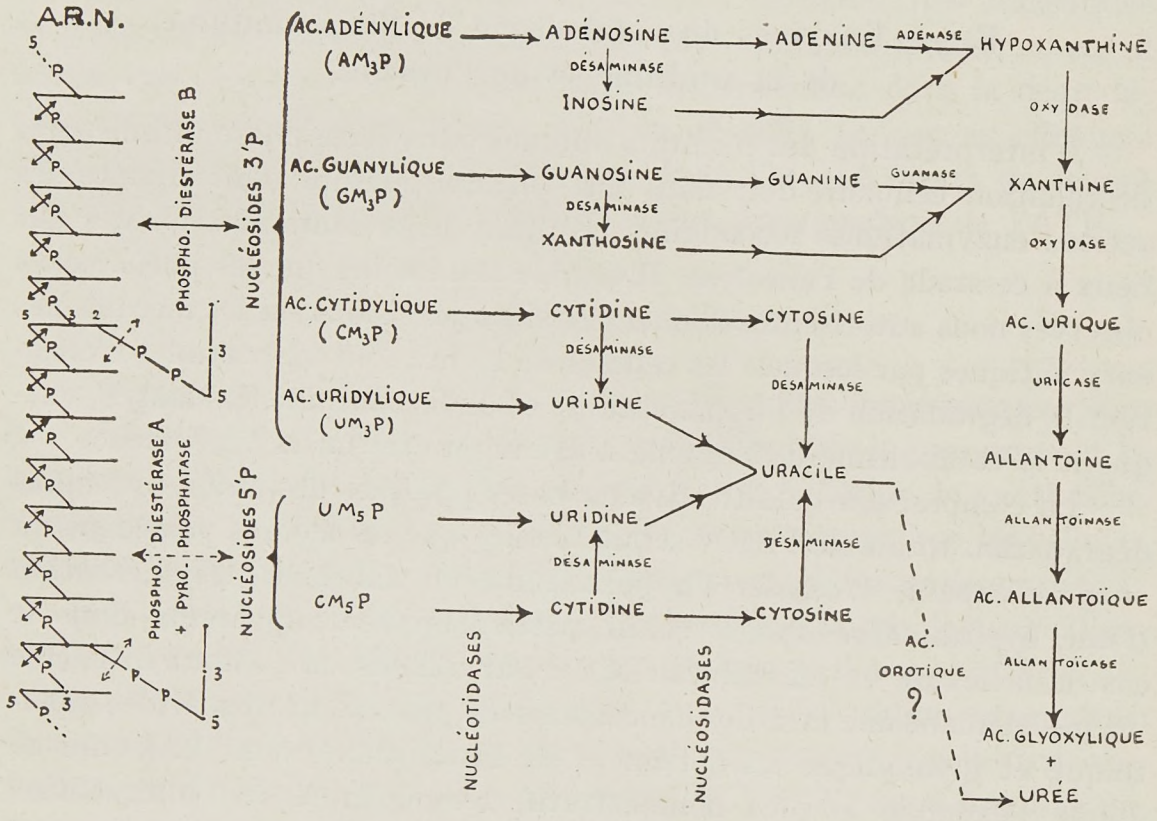
Ces conclusions sur l'aptitude des levures à effectuer la dégradation

des 2 bases puriques désaminées à un stade avancé de l'autolyse ne demeurent valables que dans la mesure où leurs activités enzymatiques sont demeurées prédominantes. Même si nos conclusions doivent être formulées avec réserve, on ne peut manquer de souligner leur similitude avec celles auxquelles sont parvenus Di Carlo et coll. (72-74) à l'aide de méthodes analytiques totalement différentes. Il convient de signaler toutefois que ces auteurs ont conclu à l'absence d'adénase et d'uricase chez *S. cerevisiae* bien que la dégradation de l'allantoïne en urée par l'intermédiaire de l'acide allantoïque ait été envisagée chez la même levure comme un mécanisme possible.

Il semble bien que les cellules de levure possèdent un équipement enzymatique leur permettant de dégrader l'uracile. Certaines et tout particulièrement la levure 6, se montrent très actives. En ce sens donc, nos

Tableau XXII

La dégradation autolytique de l'ARN chez les levures.



observations rejoignent les conclusions de Di Carlo et coll. (75). Quant aux étapes mêmes de ce catabolisme et aux enzymes qu'il met en jeu, nos résultats ne permettent pas de les préciser. Les précédents auteurs pensent que la dégradation de l'uracile en urée s'effectuerait par l'intermédiaire de l'hydro-uracile et de l'acide hydro-orotique (cf. tableau IV).

Aucun de ces 2 composés n'a été mis en évidence dans nos essais.

Nous avons seulement noté la présence d'acide orotique libre dans les cellules fraîches et son accumulation au cours de l'autolyse en présence du bromure de cétyltriméthylammonium. Nous n'avons donc aucune preuve expérimentale nous permettant de supposer que ce dérivé pyrimidique puisse constituer un produit du catabolisme de l'uracile.

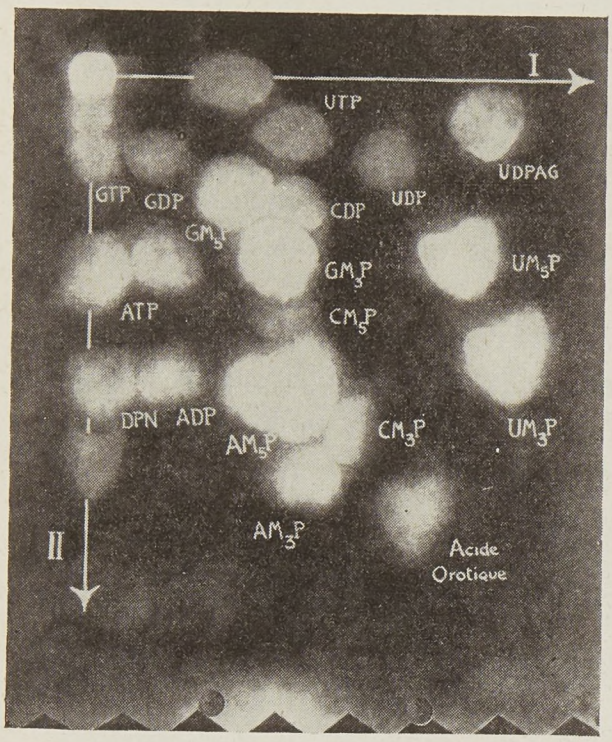
Sa présence à l'état libre dans les cellules fraîches et sa disparition progressive pendant la dégradation autolytique témoigneraient plutôt que l'acide orotique participe chez les levures à des phénomènes de biosynthèse, ainsi que des observations récentes effectuées « in vitro » semblent l'avoir montré (139-157).

Les conclusions qui se dégagent des faits précédemment établis concernant les étapes successives du catabolisme ribonucléique au cours de l'autolyse des levures et les diverses nucléases qui y participent sont résumées dans le tableau XXII, page précédente.

PLANCHE A

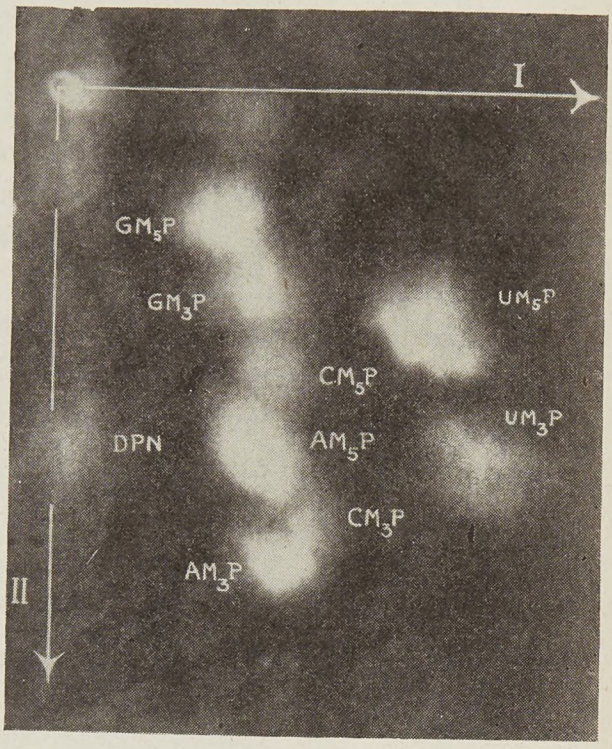
CHROMATOGRAPHIE DES NUCLÉOTIDES

Dans le système bidimensionnel
(1) Butanol tertiaire HCl 0,3N.-(2) Propanol-eau-NH_3



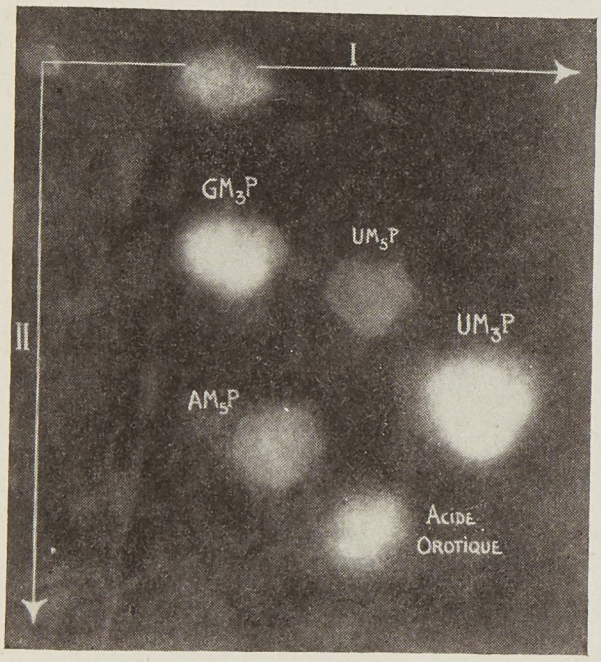
a

Nucléotides libres de S. *cerevisiæ* H.

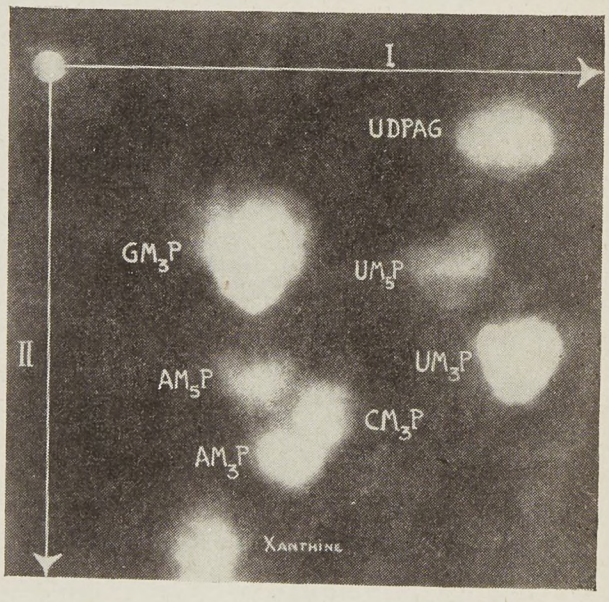


b

Nucléosides 3' phosphates et 5' phosphates



c



d

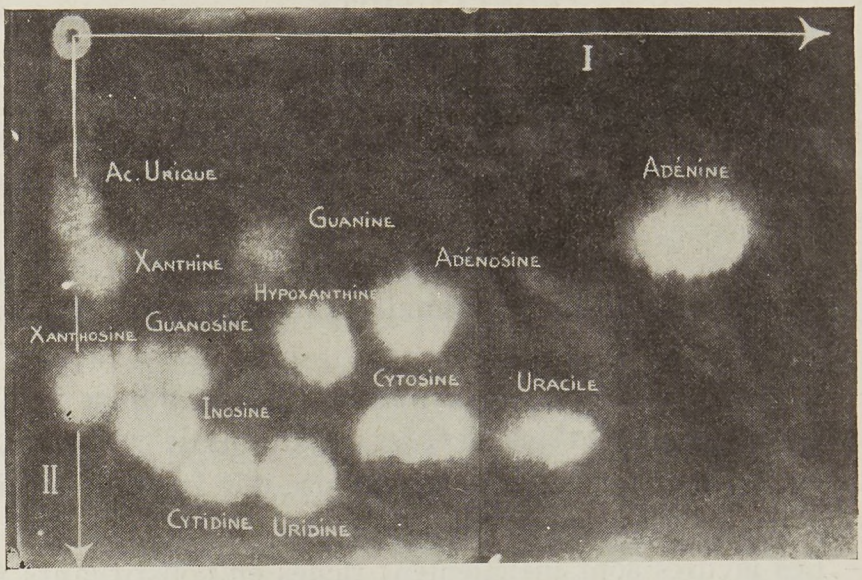
Composés libérés après autolyse de *S. cerevisiæ Hansen*
En présence de

Bromure de cétyltriméthylammonium

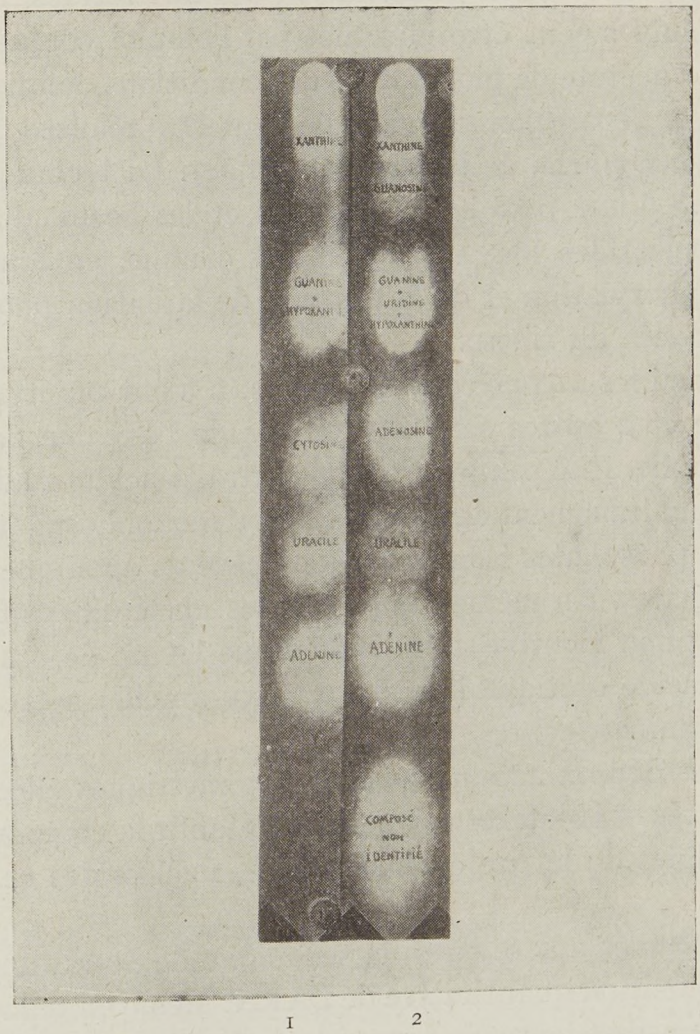
Pénicilline, auréomycine, streptomycine

PLANCHE B

CHROMATOGRAPHIE DES NUCLÉOSIDES ET DES BASES



(*a*) Séparation bidimensionnelle dans le système
(1) *n*. butanol-eau (NH_3) — (2) PO_4HNa_2 — alcool isoamylique



(*b*) Séparation unidimensionnelle dans le système *n* butanol-eau (NH_3)
1. Hydrolysat formique d'ARN. — 2. Constituants acido-solubles d'une levure de bière (n°10).

CONCLUSIONS.

Au cours de ce travail, nous avons étudié les constituants puriques et pyrimidiques de diverses levures ainsi que l'aspect physiologique et biochimique du catabolisme ribonucléique dans le cas particulier de l'autolyse cellulaire.

Dans la *première partie*, consacrée à l'étude qualitative et quantitative des composés puriques et pyrimidiques libres et polymérisés, nous avons montré que :

1. — La teneur des levures en purines et pyrimidines totales varie de façon importante selon la souche et les conditions de culture. En revanche, l'azote purique et pyrimidique représente une fraction sensiblement constante de l'azote total voisine de 11,5 p.100.

2. — Les levures sont inégalement riches en constituants puriques et pyrimidiques acido-solubles mais le rapport des 4 bases libres ou combinées est sensiblement identique d'une souche à l'autre.

3. — La précipitation quantitative des nucléotides, nucléosides et bases acido-solubles peut être effectuée par l'emploi conjugué du nitrate d'argent et de l'acétate de plomb dans des conditions définies de pH.

4. — Leur séparation individuelle peut être réalisée par chromatographie bidimensionnelle de partage sur papier. La technique élaborée à cet effet sépare d'une part les nucléosides et les bases, d'autre part les principaux nucléotides libres actuellement connus, en fonction de leur degré de phosphorylation et de la position de la liaison phosphoester sur la chaîne carbonée du ribose.

5. — Parmi les 21 nucléotides séparés, 2 n'ont pu être identifiés de façon certaine et 2 autres sont des dérivés de l'adénine dont la nature n'a pu être établie. Il se confirme que les extraits-acido-solubles de levure contiennent simultanément des nucléosides 3' monophosphates, des nucléosides 5' monophosphates isomères des précédents ainsi que leurs dérivés di et triphosphates. En même temps que les nucléosides et bases libres, un constituant non identifié a été isolé d'une levure de brasserie. Enfin, la présence d'acide orotique libre (4-carboxy-uracile) a été mise en évidence chez certaines levures.

6. — Des déterminations spectrophotométriques effectuées sur les composés séparés et identifiés ont permis d'établir la composition quantitative des cellules de levure en nucléotides, nucléosides et bases acido-solubles.

7. — Appliquée aux levures, la technique de SCHNEIDER ne permet par une détermination quantitative de l'ARN. Même en tenant compte de l'absorption parasite éventuelle des produits de dégradation des protéines, l'hydrolyse alcaline selon SCHMIDT-THANNHAUSER conduit à des concen-

trations plus élevées en ARN ainsi que l'indiquent les déterminations spectrophotométriques.

8. — La détermination quantitative des 2 types d'acides nucléiques par l'intermédiaire du phosphore n'est pas spécifique. Par différence entre les valeurs expérimentales fournies par le dosage du P de la fraction ribonucléique et celles données par les mesures d'absorption ultra-violette, il est possible d'évaluer la teneur en P des polyphosphates « insolubles » comprise entre 0 et 11,7 p. 100 du P total selon les levures. Dans les mêmes conditions, l'analyse de la fraction désoxyribonucléique met en évidence l'existence d'un constituant phosphoré non nucléique dont le P représente de 0,17 à 2,40 p. 100 du P total.

9. — Aucune forme phosphorée d'origine protéique n'a pu être mise en évidence ; la présence de composés puriques et pyrimidiques dans les produits d'hydrolyse d'une préparation considérée comme phosphoprotéine, montre que le P constituant est d'origine ribonucléique.

10. — Etablies à partir des mesures d'absorption ultra-violette, les teneurs des cellules en acides nucléiques sont extrêmement variables ; elles s'échelonnent, selon les levures, entre 3,9 et 9,4 p. 100 pour l'ARN, entre 0,170 et 0,372 pour l'ADN. Exprimé en p. 100 du P total, le P ribonucléique varie de 25,8 à 57,6 et le P désoxyribonucléique de 0,72 à 2,66.

11. — Certaines méthodes d'isolement et de purification modifient plus ou moins profondément la composition nucléotidique de l'ARN cellulaire. La déprotéinisation des préparations aurait pour effet d'éliminer plus particulièrement certains groupements de nature pyrimidique.

12. — La composition quantitative en nucléotides déterminée sans isolement préalable, fait apparaître l'existence de 2 types distincts d'ARN selon que le rapport guanine/adénine est supérieur ou inférieur à l'unité. En outre, à l'intérieur d'un même type, les nucléotides constituants sont de façon constante associés entre eux dans les mêmes rapports, indépendamment de la concentration des cellules en ARN et de leurs conditions antérieures de développement.

La *seconde partie* de notre travail, principalement consacrée aux produits intermédiaires du catabolisme ribonucléique des cellules autolysées spontanément ou en présence d'effecteurs d'enzymes, a permis l'étude indirecte des nucléases intervenant aux divers stades de la dégradation. Nous avons pu ainsi :

1. — Préciser le comportement des nucléases des levures vis-à-vis de divers composés chimiques (métaux, réducteurs, inhibiteurs généraux du métabolisme) et biologiques (antibiotiques) et montrer que :

2. — Les antibiotiques, indépendamment de leur origine, exercent sur le catabolisme ribonucléique des levures une action inhibitrice affectant à des degrés divers l'ensemble des systèmes enzymatiques qui y participent. Cette inhibition détermine, comme il a été antérieurement observé

chez *S. aureus*, l'accumulation d'un dérivé de l'uridine 5' pyrophosphate et s'exerce plus particulièrement sur les nucléotidases des acides uridylique et guanylique ainsi que sur les nucléosidases pyrimidiques.

3. — Le complexe ribonucléasique des levures est formé d'au moins 2 groupes distincts de phosphodiestérases libérant successivement et respectivement des nucléosides pyrimidiques 5' pyrophosphates et les 4 nucléosides puriques et pyrimidiques 3' monophosphates.

4. — Ce complexe ribonucléasique manifeste d'autre part une spécificité différente de celle de la ribonucléase pancréatique utilisée dans les études « in vitro » ainsi que le mettent en évidence au cours de l'autolyse spontanée la libération simultanée des 4 nucléosides 3' phosphates et la constance des proportions moléculaires des nucléotides correspondants de la fraction ribonucléique résiduelle.

5. — Des nucléotidases différentes participent spécifiquement à la déphosphorylation des nucléosides 3' monophosphates : d'une part l'inhibition de la déphosphorylation par certains effecteurs peut n'intéresser qu'un seul nucléotide, d'autre part l'étude de la libération en fonction du pH de l'ortho-phosphate d'origine nucléique montre que les levures manifestent des activités phosphomonoestérases différentes.

6. — Les levures semblent dépourvues d'enzymes désaminant les ribomononucléotides, la désamination n'intervenant qu'au stade nucléoside. On met en évidence l'intervention de nucléosidases, de nucléoside-désaminases et d'enzymes désaminant les bases puriques et la cytosine.

7. — En admettant que l'activité enzymatique des levures demeure prédominante aux stades les plus poussés de l'autolyse, la dégradation de l'hypoxanthine et de la xanthine s'effectuerait selon un mécanisme analogue à celui du catabolisme animal par l'intermédiaire de l'acide urique. A des degrés divers, les levures seraient de même capables de dégrader l'uracile, mais on n'a pu préciser par quelle voie.

8. — Toutes les levures examinées effectuent la dégradation du ribose, mais ne présentent pas toutes à ce sujet la même activité.

9. — On admet que les nucléosides pyrimidiques 5'-pyrophosphates accumulés dans certains cas d'inhibition ne constituent qu'une fraction limitée des nucléotides de l'ARN et sont fixés latéralement de façon labile sur les chaînes polynucléotidiques. Ces groupements pyrimidiques latéraux, de même structure que certains composés préexistants dans les cellules, pourraient donner lieu à des réactions d'échange réversibles entre les polynucléotides de l'ARN et les nucléotides libres, lesquels interviendraient alors comme précurseurs dans la biosynthèse ribonucléique.

10. — La présence d'acide orotique libre dans les cellules intactes et son accumulation dans un cas d'inhibition enzymatique au cours de l'autolyse, permettent de considérer ce composé comme un produit

normal du métabolisme cellulaire.Compte tenu de l'hypothèse précédente concernant la participation des nucléotides pyrimidiques libres à la biosynthèse de l'ARN et de certaines observations récentes selon lesquelles des extraits de levure transforment « in vitro » l'acide orotique en uridine 5' monophosphate, il n'est pas interdit d'envisager que l'acide orotique puisse constituer un précurseur naturel de la biosynthèse ribonucléique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Abrams (R.). — *Arch. Biochem.*, **30,** 44, 1951.
(2) Albaum (H. G.) et Umbreit (W. W.). — *J. Biol. Chem.*, **167**, 369, 1947.
(3) Allen (F. W.) et Eiler (J. J.). — *J. Biol. Chem.*, **137,** 757, 1941.
(4) Allouf (R.) et Macheboeuf (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34,** 215, 1952.
(5) Amberg (S.) et Jones (W.). — *J. Biol. Chem.*, **13,** 441, 1912-13.
(6) Aminoff (D.), Morgan (W. T. J.) et Watkins (W. M.). — *Biochem. J.*, **51,** 379, 1952.
(7) Anand (N.), Clark (V. M.), Hall (R. H.) et Todd (A. R.). — *J. Chem. Soc.*, 3665, 1952.
(8) Anderson (A. S.), Barker (G. R.), Gulland (J. M.) et Lock (M. V). — *J. Chem. Soc.*, 369, 1952.
(9) Arvidson (H.), Eliason (N. A.), Hammarsten (E.), Reichard (P.), Von Ubish (H.) et Bergstrom (S.). — *J. Biol. Chem.*, **179,** 169, 1949.
(10) Ayengar (P.), Gibson (D. M.), Peng (C. H. L.) et Sanadi (D. R.). — *J. Biol. Chem.*, **218**, 521, 1956.
(11) Baddiley (J.) et Mathias (A. P.). — *J. Chem. Soc.*, 2723, 1954.
(12) Bailey (K.). — *Biochem. J.*, **45,** 479, 1949.
(13) Bain (J. A.) et Rush (H. P.). — *J. Biol. Chem.*, **153,** 659, 1944.
(14) Baumann (E. J.). — *J. Biol. Chem.*, **33,** 14, 1918.
(15) Beaune (A.) et Periat (R.). — *C. R. Acad. Sc.*, **232,** 896, 1951.
(16) Beinert (H.), Von Korff (R. W.), Green (D. E.), Buyske (D. A.), Handschumacher (R. E.), Higgins (H.) et Strong (F. M.). — *J. Biol. Chem.*, **200,** 385, 1953.
(17) Bell (R. D.) et Doisy (E. A.). — *J. Biol. Chem.*, **44,** 55, 1920.
(18) Bendich (A.), Russell (P. J.) et Brown (G. B.). — *J. Biol. Chem.*, **203,** 305, 1953.
(19) Benedict (S. R.). — *J. Biol. Chem.*, **51**, 187, 1922.
(20) Bielchowski (F.). — *Z. Physiol. Chem.*, **190,** 15, 1920.
(21) Block (R. J.), Durrum (E. L.) et Zweig (G.). — A Manual of paper chromatography and paper electrophoresis, chap. IX. Purines Pyrimidines and related substances p. 206-211. Académic Press Inc. Publish. New-York 1955.
(22) Block (W. D.) et Geib (N. C.). — *J. Biol. Chem.*, **168,** 747, 1947.
(23) Bolomey (R. A.) et Allen (F. W.). — *J. Biol. Chem.*, **144,** 113, 1942.
(24) Boulanger (P.) et Montreuil (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33,** 791, 1951.
(25) Boulanger (P.), Montreuil (J.) et Masse (L.). — *C. R. Acad. Sc.*, **232,** 1256, 1951.
(26) Bourdet (A.). — 9e Congrès Intern. Ind. Agric. C. S 1,1, Rome 1952.
(27) Bourdet (A.) et Mandel (P.). — *C. R. Acad. Sc.*, **237,** 530, 1953.
(28) Bourdet (A.), Mandel (P.) et Guillemet (R.). — *C. R. Acad. Sc.*, **232,** 756, 1951.
(29) Brachet (J.). — *Enzymologia*, **10,** 87, 1941.
(30) Brawerman (G.) et Chargaff (E.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **16,** 524, 1955.
(31) Briggs (W.). — *J. Biol. Chem.*, **53**, 13, 1922.
(32) Buchanan (O. H.), Block (W. D.) et Christman (A. A.). — *J. Biol. Chem.*, **157,** 181, 1945.
(33) Buchanan (J. B.), Dekker (C. A.) et Long (A. G.). — *J. Chem. Soc.*, 3162, 1950.
(34) Buchel (L.), Lévy (J.) et Michel (E.). — *J. Physiol.*, **44,** 173, 1952.
(35) Buell (M. V.). — *J. Biol. Chem.*, **150,** 389, 1943.
(36) Cabib (E.) et Leloir (L. F.). — *J. Biol. Chem.*, **206,** 779, 1954.

(37) Cabib (E.), Leloir (L. F.) et Cardini (C. E.). *J. Biol. Chem.*, **203**, 1055, 1953.
(38) Cantoni (G. L.). — *J. Biol. Chem.*, **204**, 403, 1953.
(39) Caputto (R.), Leloir (L. F.), Cardini (C. E.) et Paladini (A. C.). — *J. Biol. Chem.*, **184**, 333, 1950.
(40) Cardini (C. E.), Caputto (R.), Paladini (A. C.) et Leloir (L. F.). — *Nature*, **165**, 191, 1950.
(41) Carter (C. E.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 1466, 1950.
(42) Carter (C. E.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 1508, 1951.
(43) Carter (C. E.) et Cohn (W. E.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 2604, 1950.
(44) Carter (C. E.) et Greenstein (J. P.). — *J. Nat. Cancer Inst.*, **7**, 29, 1946-47.
(45) Caspersson (T.). — *Naturwiss.*, **29**, 33, 1941.
(46) Caspersson (T.) et Brandt (K. M.). — *Protoplasma*, **35**, 507, 1941.
(47) Ceriotti (G.). — *Nature*, **163**, 874, 1949.
(48) Chantrenne (H.). — *Bull. Soc. Chim. Belge*, **55**, 5, 1946.
(49) Chargaff (E.). — *Expérienta*, **6**, 201, 1950.
(50) Chargaff(E.) et Kream (J.). — *J. Biol. Chem.*, **175**, 993, 1948.
(51) Chargaff (E.), Magasanik (B.), Vischer (E.), Green (C.), Doniger (R.) et Elson (D.). — *J. Biol. Chem.*, **186**, 51, 1950.
(52) Chargaff (E.) et Zamenhoff (S.). — *J. Biol. Chem.*, **173**, 327, 1948.
(53) Chayen (R.), Chayen (S.) et Roberts (E. R.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 117, 1955.
(54) Christman (A. A.), Foster (P. W.) et Esterer (M. B.). — *J. Biol. Chem.*, **155**, 161, 1944.
(55) Christman (A. A.) et Ravwitch (S.). — *J. Biol. Chem.*, **95**, 115, 1932.
(56) Clark (H. W.), Dounce (A. L.) et Stotz (E.). — *J. Biol. Chem.*, **181**, 459, 1949.
(57) Clark (E. G.) et Schrywer (S. B.). — *Biochem. J.*, **11**, 319, 1917.
(58) Cohen (S. S.). — *J. Biol. Chem.*, **168**, 511, 1947. — *J. Biol. Chem.*, **166**, 393, 1946.
(59) Cohn (W. E.) et Volkin (E.). — *Nature*, **167**, 483, 1951.
(60) Cohn (W. E.) et Volkin (E.). — *J. Biol. Chem.*, **203**, 319, 1953.
(61) Conzelman (G. M.), Mandel (H. G.) et Smith (P. K.). — *J. Biol. Chem.*, **201**, 329, 1953.
(62) Crestfield (A. M.), Smith (K. C.) et Allen (F. W.). — *J. Biol. Chem.*, **216**, 185, 1955.
(63) Crosbie (G. W.), Smellie (R. M. S.) et Davidson (J. N.). — *Biochem. J.*, **54**, 287, 1953.
(64) Davidson (J. N.) et Smellie (R. M. S.). — *Biochem. J.*, **54**, 287, 1953.
(65) Davis (F. F.) et Allen (F. W.). — *J. Biol. Chem.*, **217**, 13, 1955.
(66) Dayharsh (C. A.). — *Wall. Lab. Com.*, **6**, 198, 1943.
(67) Decker (P.) et Dirr (K.). — *Biochem. Z.*, **316**, 249, 1944.
(68) Delezenne (C.) et Morel (H.).— *C. R. Acad. Sc.*, **168**, 241, 1919.
(69) Deutsch (A.), Zuckerman (R.) et Dunn (M. S.). — *Analyt. Chem.*, **24**, 1769, 1952.
(70) Di Carlo (F. J.) et Schultz (A. S.). — *Arch. Biochem.*, **17**, 293, 1948.
(71) Di Carlo (F. J.), Schultz (A. S.) et Fischer (R. A.). — *Arch. Biochem.*, **20**, 90, 1949.
(72) Di Carlo (F. J.), Schultz (A. S.) et Mc. Mannus (D. K.). — *J. Biol. Chem.*, **189**, 151, 1951.
(73) Di Carlo (F. J.), Schultz (A. S.) et Kent (A. M.). — *J. Biol. Chem.*, **194**, 769, 1952.
(74) Di Carlo (F. J.), Schultz (A. S.) et Kent (A. M.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **44**, 468, 1953.
(75) Di Carlo (F. J.), Schultz (A. S.) et Kent (A. M.). — *J. Biol. Chem.*, **199**, 333, 1952.

(76) Dickens (F.). — *Nature*, **138**, 1057, 1936. — *Biochem. J.*, **22**, 1626, 1938.
(77) Dimroth (K.) et Jaenicke (L.). — *Z. Naturforsh.*, **5**b, 185, 1950.
(78) Dimant (E), Sanadi (D. R.) et Huenneckens (F. M.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 5440, 1952.
(79) Dirr (K.) et Decker (P.). — *Biochem. Z.*, **316**, 239, 1944.
(80) Dische (Z.). — *Microchem.*, **8**, 4, 1930.
(81) Dresel (E. I. B.). — *Biochem. J.*, **54**, 654, 1953.
(82) Dufrenoy (J.) et Pratt (R.). — Sympos. sur le mode d'action des antibiotiques, 21 juillet 1952.
(83) Ebel (J. P.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34**, 491, 1952.
(84) Elson (D.) et Chargaff (E.). — *Nature*, **173**, 1037, 1954 et *Biochim. Biophys. Acta*, **17**, 365, 1955.
(85) Enari (T. M.), Hyvarinen (A.) et Erkama (J.). — *Suomen Kemistil*, **28**, 54, 1955.
(86) Euler (von, H.) et Hahn (L.). — *Arkiv. Kemi. Mineral. geol.*, **24** A, 1, 1947. — **25** A, nº 11, 1948.
(87) Fischer (F. G.), Böttger (I.) et Lehmann-Echternacht (H.). — *Z. Physiol. Chem.*, **271**, 246, 1941.
(88) Fletcher (W. E.), Gulland (J. M.) et Jordan (D. O.). — *J. Chem. Soc.*, 33, 1944.
(89) Fleury (P.) et Courtois (J.). — Les Diastases, Armand Colin éd. Paris, 1948.
(90) Frieden (E. H.) et Frazier (C. N.). — *Arch. Biochem.*, **15**, 265, 1947.
(91) Gibbs (M.), Earl (J. M.) et Ritchie (J. L.). — *J. Biol. Chem.*, **217**, 161, 1955.
(92) Golwaitt (D. A.) et Bendich (A.). — *J. Biol. Chem.*, **196**, 842, 1952.
(93) Gros (F.), Beljanski (M.) et Macheboeuf (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 1696, 1951.
(94) Gros (F.) et Macheboeuf (M.). — *Ann. Inst. Pasteur*, **74**, 368, 1948.
(95) Gros (F.), Rybak (B.), Macheboeuf (M.) et Rambech (U.). — *C. R. Acad. Sc.*, **226**, 1550, 1948.
(96) Grumberg-Manago (M.), Ortiz (P. J.) et Ochoa (S.). — *Science*, **122**, 907, 1955.
(97) Gulland (J. M.) et Jackson (E. M.). — *J. Chem. Soc.*, 1492, 1938.
(98) Gulland (J. M.) et Walsh (E. O.). — *J. Chem. Soc.*, 172, 1945.
(99) Haem (H.) et Leopold (H.). — *Wochschr. Brau.*, **51**, 353, 1934.
(100) Hahn (A.) et Haarmann (W.). — *Z. Biol.*, **85**, 275, 1926.
(101) Hallanger (L. D.), Laakso (J. W.) et Schultze (M. O.). — *J. Biol. Chem.*, **202**, 83, 1953.
(102) Hanes (C. S.) et Isherwood (F. A.). — *Nature*, **164**, 1107, 1949.
(103) Hansen (R. G.) et Freedland (R. A.). — *J. Biol. Chem.*, **216**, 303, 1955.
(104) Hems (R.) et Bartley (W.). — *Biochem. J.*, **55**, 434, 1953.
(105) Heppel (L. A.) et Hilmoe (R. J.). — *J. Biol. Chem.*, **198**, 683, 1952.
(106) Heppel (L. A.), Markham (R.) et Hilmoe (R. J.). — *Nature*, **171**, 1952, 1953.
(107) Herbert (E.), Potter (V. R.) et Takagi (Y.). — *J. Biol. Chem.*, **213**, 923, 1955.
(108) Hesseltine (C. W.), Hauck (M.), Hayen (M. T.) et Bohonos (N.). — *J. Bact.*, **64**, 55, 1952.
(109) Hoffman-Ostenhoff (O.) et Weigert (W.). — *Naturwiss.*, **39**, 303, 1952.
(110) Holden (M.) et Pirie (N. W.). — *Biochem. J.*, **60**, 53, 1955.
(111) Hotchkiss (R. D.). — *J. Biol. Chem.*, **175**, 315, 1948.
(112) Hurlbert (R. B.) et Reichard (P.). — *Acta Chem. Scand.*, **9**, 251, 1955.
(113) Hurlbert (R. B.), Schmitz (H.), Brumm (A. F.) et Potter (V. R.). — *J. Biol. Chem.*, **209**, 23, 1954.
(114) Inagaki (T.). — *J. Biochem. Japan*, **32**, 57, 1940.

(115) Irwin (A. R.) et Schweigert (B. S.). — *J. Biol. Chem.*, **202,** 635, 1953.
(116) Jacobson (P.) et De Azevedo (D.). — *C. R. Soc. Biol.*, **147,** 1828, 1953.
(117) Janot (M. M.) et Keufer (J.). — Mécanismes biochimiques de l'activité des antibiotiques. Masson éd. Paris 1953.
(118) Jeener (R.) et Brachet (J.). — *Bières et boissons*, **23,** 420, 1942.
(119) Jeener (R.) et Brachet (J.). — *Enzymologia*, **11,** 222, 1943-45.
(120) Jones (W.). — Nucleic Acids, their chemical properties and physiological conduct. Monograph. on Biochemistry. Londres et New-York, 2e édition, **111,** 1920.
(121) Juni (E.), Kamen (M.), Reiner (J.) et Spiegelman (S.). — *Arch. Biochem.*, **18,** 387, 1948.
(122) Kalkar (H. M.). — *J. Biol. Chem.*, **167,** 429, 1947.
(123) Kaplan (N. O.) et Greenberg (D. M.). — *J. Biol. Chem.*, **156,** 511, 1944.
(124) Karrer (P.), Frei (P.) et Meerwein (E.). — *Helvet. Chim. Acta*, **20,** 79, 1937.
(125) Karrer (P.), Frei (P.), Ringier (B. H.) et Bendas (J.). — *Helvet. Chim. Acta*, **21,** 826, 1938.
(126) Katchman (B. J.) et Van Wazer (J. R.). — *Biochim. Biophys. Acta*. **14,** 445, 1954.
(127) Kay (H. D.). — *Biochem. J.*, **20,** 791, 1926.
(128) Kerr (S. E.). — *J. Biol. Chem.*, **132,** 147, 1940.
(129) Kerr (S. E.) et Blish (M. E.). — *J. Biol. Chem.*, **98,** 193, 1932.
(130) Kerr (S. E.) et Seraidarian (K.). — *J. Biol. Chem.*, **159,** 211, 1945.
(131) Kerr (S. E.), Seraidarian (K.) et Wargon (M.). — *J. Biol. Chem.*, **181,** 761, 1949.
(132) Kerr (S. E.), Seraidarian (K.) et Wargon (M.). — *J. Biol. Chem.*, **181,** 773, 1949.
(133) Khouvine (Y.) et De Robichon-Szulmajster (H.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34,** 1050 et 1056, 1952.
(134) Kiessling (W.) et Meyerhof (O.). — *Biochem. Z.*, **296,** 410, 1938.
(135) Klénow (H.). — *Biochem. J.*, **50,** 404, 1952.
(136) Klotz (I. M.), Urquahrt (J. M.) et Weber (W. W.). — *Arch. Biochem.*, **26,** 420, 1950.
(137) Koch (R.). — *Brasserie Malterie belge*, **3,** 250, 1953.
(138) Komarova (L. T.). — *Mikrobiologija, S. S. S. R.*, **22,** 566, 1953.
(139) Kornberg (A.), Lieberman (I.) et Simms' (E. S.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **76,** 2027, 1954. — et *J. Biol. Chem.*, **215,** 389, 1955.
(140) Kornberg (A.) et Pricer (W. E.). — *Biochem. Prepar.*, **3,** 20, 1953.
(141) Kossel (A.). — *Arch. Anat. Physiol., Physiol. Abstr.*, 160, 1893.
(142) Krampitz (L. O.) et Werkman (C. H.). — *Arch. Biochem.*, **12,** 57, 1947.
(143) Kream (J.) et Chargaff (E.). — *Fed. Proc.*, **9,** 192, 1950. — *J. Am. Chem. Soc.*, **74,** 4274, 1952.
(144) Kuen (F. M.) et Püringer (K.). — *Z. Physiol. Chem.*, **272,** 113, 1934.
(145) Kunitz (M.). — *J. Gen. Physiol.*, **24,** 15, 1940.
(146) Kutscher. — *Z. Physiol. Chem.*, **32,** 59 et 419, 1901.
(147) Kutscher et Lohmann. — *Z. Physiol. Chem.*, **39,** 159 et 313, 1903.
(148) Lamanna (C.) et Mallette (M. F.). — *Arch. Biochem.*, **24,** 451, 1949.
(149) Lattebrade (C.) et Macheboeuf (F.). — *Ann. Inst. Pasteur*, **81,** 631, 1951.
(150) Laufer (L.), Schwarz (D. R.) et Stewart (E. D.). — *J. Agr. Food Chem.*, **1,** 91, 1953.
(151) Lederer (E.) et Lederer (M.). — Chromatography : A review of principles and applications — chap. XXIX. Purines pyrimidines and related compounds, p. 235-245 Elsevier Publish. Cy. Amsterdam. Houston. London. New-York 1954.
(152) Ledoux (L.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **13,** 121, 1954.
(153) Leloir (L. F.). — *Phosphorus Metabolism*, **1,** 67, 1951.

(154) Leloir (L. F.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **33,** 186, 1951.
(155) Leone (E.) et Scale (E.). — *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **26,** 1223, 1950.
(156) Levene (P. A.) et Bass (L. W.). — *Nucleic Acids Amer. Chem. Soc.* Monograph Series, New-York, 167, 1931.
(157) Lieberman (I.), Kornberg (A.) et Simms (E. S.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **76,** 2844, 1954 et *J. Biol. Chem.*, **215,** 403, 1955.
(157 *bis*) Lieberman (I.), Kornberg (A.) et Simms (E. S.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **76,** 3608, 1954. — *J. Biol. Chem.*, **215,** 429, 1955.
(158) Lipton (S. H.), Morell (S. A.), Frieden (A.) et Bock (R. M.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **75,** 5449, 1953.
(159) Lohman (K.). — *Biochem. Z.*, **282**, 109, 1935.
(160) Loring (H. S.) et Carpenter (F. H.). — *J. Biol. Chem.*, **150,** 381, 1943.
(161) Loring (H. S.), Carpenter (F. H.) et Roll (P. M.). — *J. Biol. Chem.*, **169,** 601, 1947.
(162) Loring (H. S.), Fairley (J. L.) et Seagran (H. L.). — *J. Biol. Chem.*, **197,** 823, 1952.
(163) Loring (H. S.), Fairley (J. L.), Bortner (H. W.) et Seagran (H. L.). — *J. Biol. Chem.*, **197,** 809, 1952.
(164) Loring (H. S.) et Pierce (J. G.). — *J. Biol. Chem.*, **153,** 61, 1944.
(165) Lutwak-Mann (C.). — *Biochem. J.*, **30,** 1405, 1936.
(166) Mac Farlane (M. G.). — *Biochem. J.*, **30,** 1369, 1936.
(167) Mac Fayden (D. A.). — *J. Biol. Chem.*, **107,** 297, 1934.
(168) Macheboeuf (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **30,** 161, 1948.
(169) Macheboeuf (M.) et Delsal (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **25,** 116, 1943.
(170) Magasanick (B.) et Brooke (M. S.). — *J. Biol. Chem.*, **206,** 83, 1954.
(171) Magasanick (B.) et Chargaff (E.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **7,** 396, 1951.
(172) Makitalo (R.), — *Ann. Med. Exper. Biol. Fenniae*, **31,** 348, 1953.
(173) Malkov (A. M.). — *Doklady. Akad. Nauk., S. S. S. R.*, **72,** 85, 1950. — *Abstr. Wall. Lab. Com.*, **14,** 149, 1951.
(174) Mallette (M. F.) et Lamanna (C.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **47,** 174, 1953.
(175) Mandel (J. A.) et Dunham (E. K.). — *J. Biol. Chem.*, **11,** 85, 1912.
(176) Manson (L. A.) et Lampen (J. O.). — *J. Biol. Chem.*, **193,** 539, 1951.
(177) Markham (R.) et Smith (J. D.). — *Biochem. J.*, **45,** 294, 1949.
(178) Markham (R.) et Smith (J. D.). — *Biochem. J.*, **49,** 401, 1951.
(179) Markham (R.) et Smith (J. D.). — *Research.*, **4,** 344, 1951.
(180) Markham (R.) et Smith (J. D.). — *Biochem. J.*, **52,** 552, 558 et 565, 1952.
(181) Markham (R.), Matthews (R. E. F.) et Smith (J. D.). — *Nature*, **173,** 537, 1954.
(182) Marrian (D. H.), Spicer (V. L.), Balis (M. E.) et Brown (G. B.). — *J. Biol. Chem.*, **189,** 533, 1951.
(183) Marshak (A.) et Vogel (H. J.). — *J. Biol. Chem.*, **189,** 597, 1951. — *Feder. Proc.*, **9,** 85, 1950.
(184) Massart (L.), Peeters (G.) et Van Houcke (A.). — *Expérientia*, **3,** 494, 1947.
(185) Meisenheimer (J.). — *Hoppe Seyler's Physiol. Chem.*, **144,** 245, 1921.
(186) Mejbaum (W.). — *Z. Physiol. Chem.*, **258,** 117, 1939.
(187) Merrifield (R. B.) et Woolley (D. W.). — *J. Biol. Chem.*, **197,** 521, 1952.
(188) Mitchell (P. D.). — *Nature*, **164,** 269, 1949.
(189) Mitchell (H. K.), Houlaham (M. B.) et Nyc (J. F.). — *J. Biol. Chem.*, **172,** 525, 1948.
(190) Mitchell (P. D.) et Mayle (J.). — *J. Gen. Microbiol.*, **5,** 421, 1951.
(191) Miura (Y.) et Nakamura (Y.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33,**1409, 1951.
(192) Munch-Petersen (A.), Kalkar (H. M.), Cutolo (E.) et Smith (E. B.). — *Nature*, **172,** 1036, 1953.

(193) Navassart (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, **70,** 189, 1910.
(194) Needham (D. M.). — *Biochem. J.*, **36,** 113, 1942.
(195) Neubauer .—. *Z. Anal. Chem.*, **6,** 33, 1867.
(196) Nielands (J. B.) et Akeson (A.). — *J. Biol. Chem.*, **188,** 307, 1951.
(197) Ogur (M.), Minckler (S.), Lindegren (G.) et Lindegren (C. C.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **40,** 175, 1952.
(198) Ogur (M.) et Rosen (G.). — *Arch. Biochem.*, **25,** 262, 1950.
(199) Ohlmeyer (P.). — *J. Biol. Chem.*, **190,** 21, 1951.
(200) Paladini (A. C.) et Leloir (L. F.). — *Biochem. J.*, **51,** 426, 1952.
(201) Park (J. T.). — *Feder. Proc.*, **9,** 213, 1950.
(202) Park (J. T.). — *J. Biol. Chem.*, **194,** 877, 885, 897, 1952.
(203) Park (J. T.) et Johnson (M. J.). — *J. Biol. Chem.*, **179,** 585, 1949.
(204) Parker (G.). — *Biochem. J.*, **51,** 389, 1952.
(205) Peynaud (E.) et Lafourcade (S.). — *Rev. Ferment. Ind. Alim.*, **8,** 228, 1953.
(206) Ploeser (J. M.) et Loring (H. S.). — *J. Biol. Chem.*, **178,** 431, 1949.
(207) Pohle (K.). — *Z. Physiol. Chem.*, **185,** 9, 1929.
(208) Pratt (R.) et Dufrenoy (J.). — *Rev. Pathol. Comp. Hyg. gén.*, **50,** 864, 1950.
(209) Rapoport (S.). — *J. Biol. Chem.*, **165,** 429, 1945.
(210) Rautanen (N.) et Siurola (K.). — *Acta Chem. Scand.*, **8,** 106, 1954.
(211) Reichard (P.). — *Acta, Chem. Scand.*, **3,** 422, 1949.
(212) Rogers (H. J.). — *Nature,* **153,** 251, 1944.
(213) Roth (J. S.). — *J. Biol. Chem.*, **208,** 181, 1954.
(214) Roush (A. H.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **50,** 510, 1954.
(215) Sable (H. Z.). — *Biochim. Biophys. Acta,* **8,** 687, 1952.
(216) Sacks (J.). — *J. Biol. Chem.*, **181,** 665, 1949.
(217) Salkowski (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, **13,** 506, 1889.
(218) Salkowski (E.). — *Arch. Ges. Physiol.*, **69,** 280, 1898.
(219) Schaffner (A.) et Krumey (F.). — *Z. Physiol. Chem.*, **255,** 145, 1938.
(220) Schindler (S.). — *Z. Physiol. Chem.*, **13,** 432, 1889.
(221) Schlamowitz (M.) et Garner (R. L.). — *J. Biol. Chem.*, **163,** 487, 1946.
(222) Schlenk (F.) et Smith (R. L.). — *J. Biol. Chem.*, **204,** 27, 1953.
(223) Schlenk, (F.) et Tillotson (J. A.). — *J. Biol. Chem.*, **206,** 687, 1954.
(224) Schmidt (G.), Cubiles (R.), Swartz (B. H.) et Thannhauser (S. J.). — *J. Biol. Chem.*, **170,** 759, 1947.
(225) Schmidt (G.), Cubiles (R.), Zollner (N.), Hecht (L.), Strickler (N.), Seraidarian (K.), Seraidarian (M.) et Thannhauser (S. J.). — *J. Biol. Chem.*, **192,** 715, 1951.
(226) Schmidt (G.), Hecht (L.) et Thannhauser (S. J.). — *J. Biol. Chem.*, **166,** 775, 1946.
(227) Schmidt (G.) et Levene (P. A.). — *J. Biol. Chem.*, **126,** 423, 1938.
(228) Schmidt (G.) et Thannhauser (S. J.). — *J. Biol. Chem.*, **161,** 83, 1945.
(229) Schmitz (H.). — *Biochem. Z.*, **325,** 555, 1954.
(230) Schmitz (H.), Hurlbert (R. B.) et Potter (V. R.). — *J. Biol. Chem.*, **209,** 41, 1954.
(231) Schneider (W. C.). — *J. Biol. Chem.*, **161,** 293, 1945.
(232) Schneider (W. C.). — *J. Biol. Chem.*, **164,** 747, 1946.
(233) Sevag (M. G.), Lackmann (D. B.) et Smollens (J.). — *J. Biol. Chem.*, **124,** 425, 1938.
(234) Smith (R. L.), Anderson (E. E.), Oberland (R. N.) et Schlenk (F.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **42,** 72, 1953.
(235) Smith (J. D.) et Markham (R.). — *Biochem. J.*, **46,** 509, 1950.
(236) Smith (R. L.) et Schlenk (F.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **38,** 159 et 167, 1952.
(237) Somogyi (M.). — *J. Biol. Chem.*, **160,** 61, 1945.
(238) Stadtman (E. R.) et Kornberg (A.). — *J. Biol. Chem.*, **203,** 47, 1953.

(239) Stanier (R. Y.) et Adams (G. A.). — *Biochem. J.*, **38,** 168, 1944.
(240) Stephenson (M.) et Trim (A. R.). — *Biochem. J.*, **32,** 1740, 1938.
(241) Steyn-Parvé (E. P.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **10,** 121, 1953.
(242) Strain (H. H.). — *C. R. Trav. Lab. Carlsberg Serie Chim.*, **3,** 149, 1940.
(243) Strandskov (F. B.) et Bokelmann (J. B.). — *Wall. Lab. Com.*, **17,** 25, 1954.
(244) Strominger (J. L.). — *Feder. Proc.*, **12,** 277, 1953.
(245) Sumner (J. B.), Krishnan (P. S.) et Sisler (E. B.). — *Arch. Biochem.*, **12,** 19, 1947.
(246) Suzuki (U.). — *J. Tokio Chem. Soc.*, **34,** 1134, 1914.
(247) Suzuki (V.), Ohdake (S.) et Mori (T.). — *Biochem. Z.*, **154,** 278, 1924.
(248) Swanson (M. A.). — *J. Biol. Chem.*, **191,** 577, 1951.
(249) Taborda (A. R.), Taborda (L. C.), Williams (J. N.) et Elvehjem (C. A.). — *J. Biol. Chem.*, **194,** 227, 1952.
(250) Tauber (H.). — The chemistry and technology of enzymes, John Wiley éd., New-York 36, 37, 1949.
(251) Thivolle (L.). — *C. R. Soc. Phys. Biol.*, **18,** 171, 1944.
(252) Thomas (P.). — Recherches biochimiques sur les protéiques des levures. Thèse, Paris 1919.
(253) Thomas (R.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **8,** 71, 1952.
(254) Trucco (R. E.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **34,** 482, 1951.
(255) Uchida (M.) et Makino (K.). — *J. Biochem. Jap.*, **40,** 55, 1953.
(256) Uroma (E.) et Virtanen (O. E.). — *Ann. Med. exptl. biol. Fenniae*, **25,** 36, 1947. — *ds Chem. Abstr.*, **43,** 2277, 1949.
(257) Venkataraman (P. R.), Venkataraman (A.), Schulman (M. P.) et Greenberg (D. M.). — *J. Biol. Chem.*, **185,** 175, 1950.
(258) Vignais (P.). — *Ann. Inst. Pasteur*, **85,** 64, 1953.
(259) Vischer (E.) et Chargaff (E.). — *J. Biol. Chem.*, **176,** 715, 1948.
(260) Voets (J. P.) et Lefebure (R. M.). — *Int. Tijds Brown. mont.*, **12,** 40, 1952-53.
(261) Volkin (E.) et Cohn (W. E.). — *J. Biol. Chem.*, **205,** 767, 1953.
(262) Von Euler (H.), Albers (H.) et Schlenk (F.). — *Z. Physiol. Chem.*, **240,** 113, 1936.
(263) Vosti (D. C.) et Joslyn (M. A.). — *Appl. Microbiol.*, **2,** 70 et 79, 1954.
(264) Wang (T. P.), Sable (H. Z.) et Lampen (J. O.). — *J. Biol. Chem.*, **184,** 17, 1950.
(265) Warburg (O.) et Christian (W.). — *Biochem. Z.*, **287,** 303, 1936.
(266) Warburg (O.) et Christian (W.). — *Biochem. Z.*, **298,** 150, 1938.
(267) Weed (L. L.), Edmonds (M.) et Wilson (D. W.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **75,** 192, 1950.
(268) Weed (L. L.) et Wilson (D. W.). — *J. Biol. Chem.*, **189,** 435, 1951.
(269) Werkheiser (W. G.) et Winzler (R. J.). — *J. Biol. Chem.*, **204,** 971, 1953.
(270) Weygand (F.), Junk (R.) et Leber (D.). — *Z. Physiol. Chem.*, **291,** 191, 1952.
(271) White (J.). — *J. Inst. Brewing*, **59,** 470, 1953.
(272) Wiame (J. M.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **1,** 234, 1947.
(273) Wiame (J. M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **28,** 552, 1946.
(274) Wiame (J. M.). — *J. Biol. Chem.*, **178,** 919, 1949.
(275) Williamson (S.) et Green (D. E.). — *J. Biol. Chem.*, **135,** 345, 1940.
(276) Wyatt (G. R.). — *Biochem. J.*, **48,** 584, 1951.
(277) Young (E. G.) et Conway (C. F.). — *J. Biol. Chem.*, **142,** 839, 1942.
(278) Zittle (C. A.). — *J. Biol. Chem.*, **163,** 111, 1946.
(279) Zittle (C. A.). — *J. Biol. Chem.*, **166,** 49, 1946.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

TRAVAUX ANTÉRIEURS

LES CONSTITUANTS PURIQUES ET PYRIMIDIQUES DES LEVURES

I. — Constituants cellulaires acido-solubles. 15
A. — Dérivés de l'adénine, de la guanine, de l'uracile et de la cytosine.
B. — Agents de précipitation.

II. — Constituants nucléiques.
A. — Teneurs des levures en acides nucléiques..... 20
B. — Composition nucléotidique de l'acide ribonucléique. 23

LA DÉGRADATION DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE DE LEVURE

I. — Les produits du catabolisme ribonucléique chez les levures autolysées 26

II. — Les enzymes du catabolisme ribonucléique chez les levures 26

III. — La dégradation de l'acide ribonucléique de levure « in vitro». 29

TRAVAUX PERSONNELS

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

I. — Matériel d'étude..... 33

II. — Conditions d'autolyse des levures.
A. — Autolyse spontanée 35
a) Emploi des antiseptiques et des antibiotiques.
b) Conditions expérimentales.
c) Examen microbiologique des autolysats.
d) Autolyse à divers pH.
B. — Autolyse en présence d'effecteurs d'enzymes..... 42

III. — Fractionnement des constituants cellulaires.
A. — Constituants acido-solubles :..... 44
a) Extraction et isolement.
b) Précipitation comparée par les sels de mercure, de plomb et d'argent.
c) Technique expérimentale utilisée.

B. — Constituants acido-insolubles..... 51
a) Extraction des constituants lipidiques.
b) Fractionnement des constituants nucléiques.
c) Isolement de la « zymocaséine » (phosphoprotéine).

IV. — Isolement et purification de l'acide ribonucléique..... 54

V. — Méthodes d'hydrolyse..... 55

VI. — Méthodes chromatographiques :
A. — Séparation des composés puriques et pyrimidiques 57
B. — Localisation des produits séparés..... 65
C. — Déterminations spectrophotométriques..... 66
D. — Identification des composés inconnus..... 68

VII. — Méthodes analytiques :
A. — Méthodes colorimétriques..... 71
B. — Détermination spectrophotométrique des acides nucléiques..... 74
C. — Autres méthodes..... 75

RÉSULTATS OBTENUS ET DISCUSSION

PREMIÈRE PARTIE

LES CONSTITUANTS PURIQUES ET PYRIMIDIQUES DES LEVURES

Résultats obtenus.

Composition des levures en purines et pyrimidines totales..... 76

I. — Constituants cellulaires acido-solubles :
A. — Purines et pyrimidines acido-solubles totales..... 78
B. — Constituants puriques et pyrimidiques libres :
1. — Etude qualitative..... 80
2. — Etude quantitative..... 87

II. — Constituants nucléiques :
A. — Teneurs des levures en acides nucléiques :
1. — Etude comparée des méthodes de SCHNEIDER et SCHMIDT-THANNHAUSER dans la détermination de l'ARN..... 90
2. — Détermination de l'ARN et de l'ADN.... 91
3. — Les phosphoprotéines des levures..... 94
4. — Les polyphosphates « insolubles » des levures..... 95
B. — Composition nucléotidique de l'acide ribonucléique:
1. — Influence des méthodes d'isolement et de purification..... 97
2. — Composition de l'ARN non isolé chez diverses levures..... 99

Discussion des résultats..... 101

DEUXIÈME PARTIE

LA DÉGRADATION AUTOLYTIQUE DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE CHEZ LA LEVURE

Résultats obtenus.

I. — Autolyse spontanée :
A. — Produits de la dégradation :
1. — Evolution des composés puriques et pyrimidiques 113
2. — Evolution de l'ortho-phosphate..... 116
3. — Influence du pH sur la libération de l'o-phosphate..... 118
B. — Fraction ribonucléique résiduelle..... 120
C. — Catabolisme des bases et du ribose..... 122

II. — Autolyse modifiée :
A. — Composés puriques et pyrimidiques de la dégradation.
1. — Inhibition thermique..... 128
2. — Action des effecteurs d'enzymes 128
B. — Sensibilité des enzymes du catabolisme ribonucléique aux effecteurs..... 131

Discussion des résultats.

I. — Action des antibiotiques sur les nucléases des levures.... 135

II. — Les nucléases des levures :
A. — Activité ribonucléasique :
1. — Sensibilité aux effecteurs..... 138
2. — Nature et mode d'action du complexe ribonucléasique..... 140
B. — Nucléotidases..... 144
C. — Nucléosidases..... 145
D. — Désaminases..... 146
E. — Enzymes du catabolisme de l'hypoxanthine, de la xanthine et de l'uracile 147

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 27-5-1957.

Dépôt légal : 2e trimestre 1957 *N° d'impression : 610*